

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica



# **Inhibición de la ruta del TGF $\beta$ por las hormonas tiroideas y sus efectos en fibrosis e inflamación**

Tesis Doctoral

Elvira Alonso Merino  
Madrid, 2016

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

# **Inhibición de la ruta del TGF $\beta$ por las hormonas tiroideas y sus efectos en fibrosis e inflamación**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

**Elvira Alonso Merino**

Licenciada en Biotecnología

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis:

**Dr. Ana Aranda**

Científico Titular del CSIC

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”,  
CSIC-UAM

**Madrid 2016**

Ana María Aranda Iriarte, Doctora en Ciencias y profesora de  
Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC,

CERTIFICA QUE: Elvira Alonso Merino, Licenciada en Biotecnología por  
la Universidad de León, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo titulado:

**“Inhibición de la ruta del TGF $\beta$  por las hormonas tiroideas y sus  
efectos en fibrosis e inflamación”**

El cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como tesis  
Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de  
Madrid.

Y para que conste donde proceda, expido el presente certificado en Madrid a  
4 de Noviembre de 2016.

Fdo. Ana María Aranda Iriarte



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Prof. Ana Aranda en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), financiado por una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad.



***A mis cuatro pilares:***

***Papá***

***Mamá***

***Alba***

***Alberto***

*“Si vienes, por ejemplo, a las cuatro de la tarde, comenzaré a ser  
feliz desde las tres”*

El principito

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Ana Aranda el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, bajo su dirección. También me gustaría agradecerle todo el apoyo que me ha brindado, su confianza en mí, todas sus enseñanzas, su trato personal, las oportunidades que me ha dado y todo lo que he aprendido de ella durante estos años. Ha sido una suerte. Gracias Ana.

Me gustaría agradecerle al Dr. Javier Regadera toda su ayuda con la anatomía patológica. Gracias por sus enseñanzas, dedicación y paciencia. Y por el tiempo y el trabajo invertido en mí. También quiero darle las gracias a Carmen, por todo su trabajo con las histologías y su disposición para ayudar siempre y por supuesto por esa sonrisa constante. Gracias a Juan por tu ayuda con las cuantificaciones y las fotos y también por los buenos momentos.

Gracias a la Dra. Susana Alemany por sus consejos, aportaciones y conocimientos compartidos sobre el mundo de la inflamación. Gracias a la Dra. Pilar Santisteban por los plásmidos y anticuerpos prestados, además de por su naturalidad y cercanía.

Gracias al Dr. Ángel Pascual por su buen humor, amabilidad, sencillez y bondad. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

Quiero agradecer también a Ana su ayuda con las ColPs, a Eva por todos sus consejos sobre la inmunohistoquímica (y por el uso de la campana! gracias a ti también María!) y a Cris por su clase magistral y personalizada de inmunos que tengo apuntadita y por el tiempo que compartimos en el labotario.

Me gustaría también agradecer al personal de servicios del IIB: animalario, cultivos, imagen, informática, protección radiológica... por vuestra disposición y porque hacéis que todo sea más fácil. Gracias a Carlos y a Diego también!

Ahora toca el turno del labo. Muchas gracias Ana por dedicarme tanto tiempo, y preocuparte, cada vez que te pregunto algo (que no son pocas las veces), por tu ayuda con la informática (comprimir poster *in extremis*, iniciación al Word... ;), por tus explicaciones científicas y todas las risas compartidas. Muchas gracias Constanza por la ayuda con la inflamación, por tus protocolos y por tus consejos, no sólo sobre ciencia. Gracias también por las conversaciones. Irene, gracias por tu ayuda con mis dudas, por los pull-down y la gradilla magnética que tanto me gusta, por los ratos en tu ex-labo y todas las reflexiones compartidas. Ola! Compañera “de lado” de laboratorio casi hasta el final. Mil gracias por tu infinita ayuda con los animales, yo sola no hubiese podido; gracias por tu paciencia, por venir fines de semana a pinchar conmigo (y encima hacerme de taxista ;). Muchas gracias también por el bombardeo de preguntas al que te sometía muchas veces y tu siempre respondías con una sonrisa. Gracias por el tiempo compartido en los congresos y por toda tu ayuda en general. Lidia! Mi Lidia! Que ya hace un tiempo que no compartimos mesa, pero aún así tengo presentes siempre tus consejos! Tu orden y buen trabajar del que tanto aprendí. Muchísimas gracias por todo tu apoyo, por las largas conversaciones, por escucharme, por las risas y por tu dulzura.

También me gustaría agradecerle a Mila su ayuda en el día a día, gracias también por las GSTs! Gracias a Alberto por sus consejos y la ayuda con la ColP con radiactividad. También gracias a Anita por ayudarme con cualquier duda que he tenido.

Muchas gracias a Aurora y a Marina. Gracias por todos vuestros consejos desde la experiencia, gracias por ofrecerme vuestra ayuda sin dudar siempre que lo he necesitado. Y gracias por todas las charlas y puestas al día de las comidas.

Gracias a los de la planta (María, Olga, Laura, Toño, Asun, Alba, Eva, Omar, Carla, Yuri, Chus, Gemma, María (gracias por ser tan buena vecina y por tu alegría contagiosa!) que hacéis/habéis hecho que sea muy agradable y divertido trabajar aquí, en la segunda planta edificio viejo ;). Mención especial para Omar, Carla y Yuri, por esas mañanas o tardes de cultivos que hacéis que sean estupendas cuando nada apunta a ello. Gracias Omar por tus conversaciones y risas, gracias Carla por tu sonrisa y por la tranquilidad que transmites, gracias Yuri por tu buen humor y tu protocolo de Maxis, que supuso un antes y un después en mi relación con ellas :P. Gemmaaa! Mil millones de gracias por toda tu ayuda desinteresada en estos últimos meses, por hacerme de guía y siempre con una sonrisa, por responder a mis dudas de neurax a cualquier hora del día y sobre todo por que me estés haciendo este camino tan fácil y acompañado de tanta risa. Gracias, gracias y gracias!

Muchas gracias a Aris, porque no me imagino un mejor compañero de congresos! Gracias por tantos buenos momentos en todo tipo de alojamientos y con variada gastronomía :P. También me gustaría darle las gracias a Sol, que vamos haciendo lo mismo desde aquel diciembre de 2012. Compartiendo dudas de papeleos, inquietudes y hasta las hormonas tiroideas! ;) Gracias a Esther, por sentirme tan identificada. Gracias también a Sandra, Silvia y Ane, que aunque no nos veamos mucho, está ese grupo ahí para recordarme lo “locas” (en el buen sentido) que estáis y para apoyarnos unas a otras. Sandra, gracias por resolverme muchas dudas científicas, eres una crack y modelo de trabajo!

Ahora toca salir fuera del IIB. Gracias Esther y Rocío, que aunque estos años hemos estado separadas, el inicio de lo que me ha traído hasta aquí lo hicimos juntas. Gracias por aquellos años, por las barrigas al sol, por las espichas, por los cafés, las cañas, y por nuestras reuniones anuales con jacuzzi apurando hasta el domingo por la tarde que hacen ver las cosas de otro modo. Gracias por vuestro apoyo en este tiempo.

Mil gracias a MIS leonesas por Madrid, a parte de por todo lo bueno vivido en tantos años juntas, gracias por nuestras charlas, desahogos, los martes de palillo largo, todo vuestro apoyo, por escucharme, aconsejarme aunque esto os pille lejos. Qué haría sin vos? MariaS, gracias por dejar que os lleve en mi tesis. Eli! A ti de leonesas por Madrid al final nos pilló poco tiempo juntas pero no olvidaré ese primer año que viví en Madrid! Gracias por hacerme sentir como en casa, por todo tu apoyo, las carcajadas, los agobios compartidos, las ilusiones. Gracias por todo lo pre-Madrid también. Gracias por sentirte ahí aunque ahora nos veamos muy poquito. Gracias por los buenísimos recuerdos chicas y los que nos quedan.

A Coral! Coris! Tu podrías entrar un poco en el IIB también! Muchas gracias por ser mi referencia, ya desde la carrera. Gracias por guiarme, por ayudarme tanto, por ese primer día que llegué Madrid para quedarme y te vi allí al bajar del tren, por ser tan buena y por nuestras largas conversaciones con tantas cosas en común.

No puedo dejar de incluir en los agradecimientos de esta tesis a Alcuetas. El lugar, su gente y lo que ello significa. Sitio para recargar las pilas, que tan importante y necesario es para mi de vez en cuando, para dormir como un bebé, para relajarte, pero también para disfrutar. Gracias a los que hacéis que eso sea así. Quisiera agradecer especialmente a “los cucuyos en Madrid” y a “las bodas cucuyas futuras/Gossip Girls”, que alguna chapa de mi tesis les ha caído también. Gracias por hacerme pasar tan buenos momentos! Como sois muchos para nombrar os van a representar nuestros peques: Jaime, Valeria, Mateo y Andrea. Gracias también a ellos, que aunque ahora no lo sepan, me hace muy feliz verles y me alegran cualquier mal momento. A Adrián y Noa también, que aunque ya no sean tan peques es genial oírles con solo salir a la puerta.

A mis chicas burgalesas, Alba y Ana Paula! En poquito tiempo os habéis convertido en alguien de siempre. Muchas gracias por acogerme tan bien en Burgos, por hacerme sentir como una más. Y gracias por todo el tiempo en Madrid, por escucharme hablar de tesis congresos y papers y por vuestros ánimos.

Cris!! Mi mejicana favorita!! Cuantas cosas compartidas! Cualquier gracias se quedaría corto. Incluso empezamos juntas en el IIB. Gracias por tanto, por las risas, los llantos, las tardes de arreglar el mundo con un chocolate, nuestras mil dudas, los desahogos, pero sobre todo por ser tú y por haber tenido la suerte de compartir tantos momentos contigo.

Anina!! Me quedas tú! Tantos años ya separadas y aunque sea con conversación por skype es como si estuviésemos esquiendo (por ejemplo ;P) hace 15 años. Gracias porque parte de lo que soy es gracias a ti, así que te corresponde un cachito de tesis. Gracias por ser esa persona con la que cuando estas con ella en momentos malos solo puedes reírte, porque contigo no hay hueco para la tristeza. Gracias por hablarme de epigenética aunque te quedases en Darwin =), gracias por esa llamada cuando no te la esperas para ver como va todo, como va el laboratorio, los papers, la tesis. Gracias por conducir dos horas (un trayecto de cuarenta minutos:) para venir a verme un ratito. Como podría escribir otra tesis si sigo así, simplemente GRACIAS Ana.

Finalmente quiero agradecerle todo su apoyo a mi familia, tíos, primos. Por alegrarse y celebrar los éxitos conmigo. Gracias a mis abuelos, que aunque no lo vayan a leer, se merecen todos mis agradecimientos por tantos y tantos buenos recuerdos y amor. A Nena, gracias por estar siempre tan pendiente, por ayudarme y creer tanto en mí. Gracias también a mis niñas, con esos abrazos que me encantan. Gracias a “Komando Kroqueto”! Gracias a Sole, la tengo que incluir porque ha marcado un punto de inflexión en mi relación con los de su especie en este tiempo.

Un apartado especial merecen mis padres. No conozco a personas mas generosas, bondadosas y desinteresadas. Gracias por todo lo que me habéis dado, por tantísima ayuda, por reiros conmigo en los buenos momentos y estar siempre al otro lado del teléfono cuando lo que tocaba era llorar. Y hacer que todo se solucionase. O simplemente por nuestras charlas y vuestros millones de consejos para la vida. Por todo lo que me habéis enseñado con vuestro ejemplo, vuestro esfuerzo, constancia e ilusión. Por vuestra dedicación y paciencia. NADA de esto hubiese sido posible sin vosotros. Sois admirables. Os quiero.

Alba, gracias. Alguien muy especial le dijo a mamá cuando naciste que eras el mejor regalo que me podían hacer. Y así ha sido, el mejor. Gracias por tu valentía y talento, por tu humor, por ser tan buena, gracias por ser la única persona con la que puedo estar horas llorando de la risa (literal) por algo que solo nos hace gracia a nosotras. Gracias por tu apoyo y complicidad, por tus palabras de ánimo. Gracias por acompañarme algún finde al labo, en el poquito tiempo que tuvimos la suerte de coincidir aquí. Gracias por preocuparte por mí, por los cafés y los desayunos. Espero enormemente que nuestros caminos se acaben juntando en un futuro. Gracias de nuevo Alba.

Y Alberto. Gracias por haber sido mi compañero de viaje en este trayecto (y en muchos otros). Con un compañero así el camino es sencillo. Gracias por aportarme la tranquilidad, por equilibrarme, por tirarme el flotador cuando yo me ahogo y el agua sólo me llega a los tobillos. Gracias por escucharme, por tus silencios cuando son necesarios. Gracias por la alegría al verte aunque el día no haya sido tan bueno, gracias por tu ayuda, por tu apoyo, por tu compañía, por tu sonrisa. Gracias por conocerme tan bien. Y ahora... cambiemos el mundo, amigo, que tu ya has cambiado el mío.

## RESUMEN/SUMMARY

---

El factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), el factor profibrogénico más importante, media sus acciones principalmente a través de los factores de transcripción Smads, los cuales se unen a los denominados Elementos de Unión a Smad (SBEs) en las regiones reguladoras de sus genes diana. En este trabajo demostramos que la hormona tiroidea triyodotironina (T3), a través de la unión a sus receptores nucleares TR $\alpha$  y TR $\beta$ , antagoniza la activación transcripcional por TGF $\beta$ /SMAD. Este antagonismo implica una reducida fosforilación de las SMADs y una interacción directa entre los receptores y las SMADs 3 y 4, que es revertida por la T3. Esta interacción, así como la inhibición de la transcripción inducida por TGF $\beta$  es independiente del dominio de unión a coactivadores del TR, necesario para la actividad transcripcional dependiente de ligando pero requiere residuos en el dominio de unión a ADN del receptor. La T3 reduce el reclutamiento de las SMADs a los SBEs en respuesta al TGF $\beta$ , disminuyendo la acetilación de histonas e inhibiendo la estimulación de la transcripción por este factor. Los TRs se unen a las regiones que contienen SBEs y esta interacción es también liberada por la T3. En consonancia con esta interacción transcripcional entre la T3 y la señalización por TGF $\beta$ , la T3 es capaz de antagonizar los procesos fibróticos *in vivo*. La fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono es atenuada por la administración previa de hormonas tiroideas a los ratones, mientras que los ratones viejos que carecen de TRs (TR KO) muestran espontáneamente signos de fibrosis con acúmulo de colágeno en el hígado. La fibrosis cutánea inducida por la administración de bleomicina en ratones es también reducida fuertemente por las hormonas tiroideas. Estos hallazgos definen una importante función de los receptores de hormonas tiroideas y sugieren que los ligandos de los TRs podrían tener efectos beneficiosos para bloquear la progresión de las enfermedades fibróticas. Ya que el proceso inflamatorio juega un papel importante en el desarrollo fibrótico, también hemos analizado el estado de los mediadores inflamatorios más relevantes. La fosforilación de Stat3 y Erk está disminuida en los hígados de los ratones fibróticos tratados con hormonas tiroideas y aumentada en los ratones TR KO, sin cambios en la producción de citoquinas. Esto sugiere que los TRs podrían reprimir directamente las respuestas celulares a estos mediadores inflamatorios. De hecho, encontramos que la T3 suprime la señalización por IL-6 en macrófagos y en células de hepatocarcinoma, inhibiendo la activación de STAT3. Consecuentemente, la hormona antagoniza fuertemente la transcripción génica estimulada por IL-6, reduciendo el reclutamiento de STAT3 y la acetilación de histonas en los genes diana de la IL-6.

Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), the most potent profibrogenic factor, mediates its actions mainly through activation of Smad transcription factors, which bind to Smad Binding Elements (SBEs) in the regulatory regions of target genes. In this work we show that the thyroid hormone triiodothyronine (T3), through binding to its nuclear receptors TR $\alpha$  or TR $\beta$ , is able to antagonize transcriptional activation by TGF $\beta$ /SMAD pathway. This antagonism involves a reduced SMAD phosphorylation and a direct interaction of the receptors with SMAD3 and SMAD4, which is reversed by T3. This interaction, as well as the inhibition of TGF $\beta$ -induced transcription, is independent of the TR domain responsible for recruitment of coactivators and ligand-dependent transcriptional activity, but requires residues in the receptor DNA binding domain. T3 reduces SMAD recruitment to the SBEs in response to TGF $\beta$ , reducing histone acetylation and inhibiting TGF $\beta$ -dependent transcription. TRs bind to the SBE-containing regions and this interaction is also released by T3. In agreement with this transcriptional cross-talk between T3 and TGF $\beta$  signaling, T3 is able to antagonize fibrotic processes *in vivo*. Liver fibrosis induced by carbon tetrachloride is attenuated by previous thyroid hormone administration to mice, whereas aged TR knockout mice show signs of spontaneous fibrosis accumulating collagen. Furthermore, skin fibrosis induced by bleomycin administration in mice is also reduced by the thyroid hormones. These findings define an important function of the thyroid hormone receptors and suggest that TR ligands could have beneficial effects to block the progression of fibrotic diseases. As inflammatory processes play an important role in fibrosis development, we also analyzed the status of the most relevant inflammatory mediators. Stat3 and Erk phosphorylation were decreased in fibrotic mice livers after thyroid hormone administration and were enhanced in TR knockout mice, without any changes in cytokine production. This suggested that TRs could directly repress the response of the cells to inflammatory mediators. Indeed, we found that T3 suppresses IL-6 signalling in macrophages and hepatocarcinoma cells, inhibiting STAT3 activation. Consequently, the hormone strongly antagonizes IL-6-stimulated gene transcription, reducing STAT3 recruitment and histone acetylation at IL-6 target promoters.

## ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1. Las hormonas tiroideas	11
1.1. Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas	11
1.2. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas	12
2. Los Receptores de las Hormonas tiroideas	14
2.1. Isoformas de los THR	14
2.2. Estructura de los receptores de hormonas tiroideas	16
3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )	17
3.1. Mecanismo de acción del TGF $\beta$	18
3.2. Factores de transcripción Smad	20
3.2.1. Estructura de las Smads	20
3.2.2. Tipos de Smads	21
3.2.3. Ciclo de señalización de las Smads	21
4. TGF $\beta$ y fibrosis	22
4.1. Fibrosis hepática	23
4.2. Esclerodermia, fibrosis cutánea	24
5. Inflamación hepática y sus principales rutas de señalización	25
5.1 Hígado e inflamación	25
5.2 IL-6 y Stat3	26
5.3 TNF $\alpha$ y NF- $\kappa$ B	28
<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
1. Líneas celulares	37
2. Plásmidos	38
2.1. Plásmidos reporteros	38
2.2. Vectores de expresión	39
2.3. Vectores de expresión de proteínas de fusión	40
3. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa	41
4. Extracción de proteínas y Western Blot	41
5. Ensayos de GST <i>pull-down</i>	42
5.1. Purificación de proteínas fusionadas a GST	42

## ÍNDICE

5.2. Ensayo de interacción proteína-proteína con GST y proteínas traducidas <i>in vitro</i>	43
5.3. Ensayo de interacción proteína-proteína con GST y extractos celulares	43
6. Ensayos de Co-inmunoprecipitación	43
7. Extracción de RNA y RT-PCR cuantitativa	44
8. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	45
9. Inmunofluorescencia	45
10. Ensayos con animales	46
10.1. Modelos animales	46
10.2. Medida de la aspartato aminotransferasa (AST)	47
10.3. Histología, inmunohistoquímica y morfometría	47
11. Análisis estadístico	48
<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
1. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la ruta del TGF $\beta$	55
1.1 La T3 antagoniza la transcripción mediada por TGF $\beta$ dependiente de SMAD	55
1.2. Tanto el TR $\beta$ como el TR $\alpha$ pueden mediar el efecto antagónico de la T3 sobre la ruta del TGF $\beta$	59
1.3. Dominios de los TRs implicados en la represión de la transcripción dependiente de TGF $\beta$ por la T3	61
1.4. Los receptores de hormonas tiroideas interaccionan con las SMADs	64
1.5. Efecto de la T3 sobre la fosforilación de las SMADs en respuesta a TGF $\beta$	69
1.6. El TR unido a su ligando no afecta la desfosforilación nuclear de las SMADs	72
1.7. La T3 inhibe el reclutamiento de las SMADS a los promotores de los genes diana del TGF $\beta$	76
2. Efecto de las hormonas tiroideas en modelos de fibrosis <i>in vivo</i>	78
2.1. En respuesta al tetracloruro de carbono los ratones hipertiroideos desarrollan un daño hepático agudo significativamente más leve que los eutiroideos	78
2.2. El desarrollo de fibrosis hepática en los ratones hipertiroideos es menor que en los eutiroideos	81
2.3. La falta de expresión de los receptores de hormonas tiroideas induce una deposición de fibras de colágeno en el hígado	83
2.4. Las hormonas tiroideas reducen el desarrollo de la fibrosis cutánea	85
2.5. Las hormonas tiroideas inhiben la señalización por TGF $\beta$ en fibroblastos	87
3. Efecto de las hormonas tiroideas en la inflamación hepática	88

3.1. Estudio de los principales marcadores de inflamación en los modelos de fibrosis hepática estudiados	88
3.2. La delección de los receptores de hormonas tiroideas aumenta la activación basal de Stat3 y Erk	90
3.3. Expresión de citoquinas inflamatorias en los diferentes modelos estudiados	90
3.4. La T3 antagoniza la señalización por IL-6 en células de hepatocarcinoma	92
3.5. La T3 reprime la expresión inducida por IL-6 de genes dependientes de Stat3 disminuyendo la unión de este factor a los promotores de sus genes diana	94
3.6 La T3 inhibe la señalización por IL-6 en macrófagos	96
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
1. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la ruta del TGFβ	101
1.1. La T3 inhibe la transcripción dependiente de Smads	101
1.2. Los TRs interaccionan con las Smads	101
1.3. Los dominios de los TRs implicados en la inhibición de la transcripción por TGFβ/Smad son diferentes a los requeridos para la transactivación dependiente de ligando	103
1.4. La T3 inhibe la fosforilación de las R-Smads, su asociación con los SBEs y la acetilación de histonas en los promotores diana del TGFβ	104
2. Efecto de las hormonas tiroideas en modelos de fibrosis <i>in vivo</i>	106
2.1. La administración de hormonas tiroideas atenúa el desarrollo de procesos fibróticos en el ratón <i>in vivo</i>	106
2.2. La T3 inhibe la activación de los fibroblastos por TGFβ	107
2.3. Los ratones que carecen de receptores de hormonas tiroideas desarrollan espontáneamente fibrosis hepática	107
2.4. Posibles efectos terapéuticos de ligandos de receptores nucleares en los procesos fibróticos	108
3. Efecto de las hormonas tiroideas en la inflamación hepática	109
3.1. La administración de hormonas tiroideas disminuye la activación de Stat3 y Erk por CCl4 en las etapas iniciales de la fibrosis	109
3.2. Las hormonas tiroideas no inhiben la producción hepática de citoquinas	110
3.3. La T3 inhibe la señalización y transcripción génica mediadas por IL-6	112
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>

ÍNDICE

**BIBLIOGRAFÍA**

119

**ANEXO**

137

## **ABREVIATURAS**

---

**Ac.H4:** histona 4 acetilada  
**AP-1:** proteína activadora 1  
**APP:** proteína de fase aguda  
**AST:** aspartato aminotransferasa  
**ATP:** adenosín trifosfato  
**BCA:** ácido bibinconínico  
**BMP:** proteína morfogenética de hueso  
**bp:** pares de bases  
**BSA:** albúmina de suero bovina  
**C-terminal:** carboxilo terminal  
**CaMKIV:** quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo IV  
**CBP:** proteína de unión a CREB  
**CCL4:** tetracloruro de carbono  
**ChIP:** ensayo de inmunoprecipitación de cromatina  
**CK2:** caseína quinasa 2  
**Co-Smad:** Smad mediadora común  
**CoR:** correpresor  
**COUP-TFII:** factor de transcripción II del promotor distal de ovalbúmina de pollo  
**CRE:** elemento de respuesta a AMP cíclico  
**CREB:** proteína de unión a CRE  
**CRP:** proteína C reactiva  
**DAB:** diaminobencidina  
**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol  
**DBD:** dominio de unión a ADN  
**DIO:** enzima desiodasa  
**DMEM:** medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco  
**DMSO:** dimetilsulfóxido  
**DR:** repetición directa  
**ECL:** quimioluminiscencia mejorada  
**ECM:** matriz extracelular  
**EDTA:** ácido etilen-diamino-tetracético  
**EGR1:** gen de respuesta temprana 1  
**EGTA:** ácido etilenglicol-bis-(b-aminoetiléter)N,N,N', N'-tetracético  
**ELISA:** *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*.  
**EMEM:** medio mínimo esencial de Eagle

## ABREVIATURAS

**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares

**FOXH1:** proteína *Forkhead* H1

**FXR:** receptor X de farnesoides

**GAPDH:** gen del ratón que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GDFs:** factores de crecimiento y diferenciación

**GFP:** proteína fluorescente verde

**Gp130:** subunidad del receptor  $\beta$  transductor de señal

**GSK3:** quinasa 3 de la glucógeno sintasa

**GST:** glutathione S-transferasa

**H4:** histona 4

**HAT:** acetiltransferasa de histonas

**HDAC:** deacetilasa de histonas

**Hepes:** N-2-hidroxietilpiperazina-N'-ácido 2-etanosulfónico

**HSC:** células hepáticas estrelladas

**I-Smad:** Smad inhibitoria

**IF:** inmunofluorescencia

**IgG:** inmunoglobulinas normales de la subclase G

**IHC:** inmunohistoquímica

**IKK:** complejo I $\kappa$ B quinasa

**IKK:** quinasa de I $\kappa$ B

**IL-1:** interleuquina 1

**IL-6:** interleuquina 6

**IL-6R:** receptor específico  $\alpha$  de la IL-6

**IPTG:** isopropil-b-D- tiogalactopiranosido

**I $\kappa$ B:** proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B

**Jaks:** quinasas janus

**KO:** *knock-out*

**LAP:** péptido asociado de latencia

**LBD:** dominio de unión a ligando

**LPS:** lipopolisacárido

**LTBP:** proteína de unión al TGF $\beta$  latente

**Luc:** luciferasa

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**MCT10:** transportador monocarboxilado dependiente de ATP 10

**MCT8:** transportador monocarboxilado dependiente de ATP 8

**MH1:** dominio Mad de Homología 1

**MMP:** metaloproteasa

**MSK:** quinasa activada por MAPK/SAPK

**N-terminal:** amino terminal

**NCoR:** Co-Represor Nuclear

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NP-40:** nonidet P-40

**NRs:** receptores nucleares

**OATP:** polipéptido transportador de aniones orgánicos

**p300:** proteína asociada a la proteína de adenovirus E19

**PAI-1:** inhibidor del activador del plaminógeno 1

**PBS:** tampón fosfato salino pH 7,5

**p.c:** post-coitum

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**pERK:** fosfo-ERK

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinasa

**PKA:** proteína quinasa A

**PKC:** proteína quinasa C

**PMSF:** fenil-metil-sulfonil-fluoruro

**pp65:** fosfo-p65

**PPAR:** receptor activador de la proliferación de peroxisomas

**PPM1:** proteína fosfatasa M

**PR:** receptor de progesterona

**pSmad2:** fosfo-Smad2

**pSmad3:** fosfo-Smad3

**PXR:** receptor X de pregnano

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa a tiempo real

**R-SMAD:** proteína SMAD regulada por receptor

**RA:** ácido retinoico

**RAR:** receptor del ácido retinoico

**RPMI:** medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

**RSK1:** quinasa S6 ribosomal

**RT:** temperatura ambiente

**rT3:** T3 reversa

**RXR:** receptor X de retinoides



## ABREVIATURAS

**S.D.:** desviación estándar

**S.E.M.:** error estándar de la media

**SAA:** proteína amiloide A sérica

**SARA:** proteína de anclaje de Smad para la activación del receptor

**SBE:** elemento de unión a Smad.

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**SEE:** síndrome del enfermo eutiroideo

**SFB:** suero fetal bovino

**SHP2:** fosfatasa 2 con el dominio de homología con src

**Ski:** proteína del Sloan Kattering Institute homóloga al oncogén viral de sarcoma de aves

**SMRT:** mediador de silenciamiento por RAR y TR

**SMURF:** factor de ubiquitinación regulador de las proteínas Smad

**SOCS3:** proteína supresora de la señalización por citoquinas-3

**STAT:** transductor de señal y activador de la transcripción

**T2:** diiodotirosina

**T3:** triiodotironina

**T4:** tiroxina

**TAE:** solución de Tris base, ácido acético y EDTA, pH 8,0

**TBK1:** quinasa de unión a TANK1

**TBS:** tampón Tris salino pH 7,5

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TGIF:** factor de interacción con 5'-TG-3'

**TH:** hormona tiroidea

**TIMP:** inhibidor tisular de metaloproteasas

**TK:** promotor basal del gen de la timidina quinasa del virus Herpes simple

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TPA:** 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato

**TR:** receptor de hormonas tiroideas

**TRE:** elemento de respuesta a hormona tiroidea

**TRH:** hormona liberadora de tirotropina

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano

**TSH:** tirotropina u hormona estimulante del tiroides

**T $\beta$ R-I:** receptor I de TGF $\beta$

**T $\beta$ R-II:** receptor II de TGF $\beta$

**T $\beta$ R-III:** receptor III de TGF $\beta$

**UAS:** secuencia activadora aguas arriba

**VDR:** receptor de vitamina D

**WT:** *wild type* (fenotipo normal)

**$\alpha$ -SMA:**  $\alpha$ -actina del músculo liso

## INTRODUCCIÓN

---

## 1. Las hormonas tiroideas

### 1.1. Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas (THs) juegan un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo y metabolismo (Aranda *et al* 2013). Estas hormonas son esenciales para el crecimiento somático y el desarrollo del sistema nervioso, afectan a la síntesis proteica y al metabolismo de carbohidratos y lípidos, son esenciales en la generación de calor, controlan funciones cardiovasculares y renales y están implicadas en la maduración de los huesos y en la función de la mayoría de los órganos y tejidos (Bernal y Refetoff 1977).

Las THs son pequeñas moléculas lipofílicas sintetizadas en la glándula tiroides por la yodación de determinados residuos del aminoácido tirosina que forman parte de la tiroglobulina. Su síntesis es estimulada por la hormona estimulante del tiroides (TSH) o tirotropina, que se produce en la hipófisis anterior y es, a su vez, regulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que se secreta en el hipotálamo. En condiciones normales existe un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual las hormonas tiroideas circulantes inhiben la secreción de TSH y TRH (Aranda *et al* 2013). Las isoformas más abundantes de las hormas tiroideas son la T3 (3,3',5-triiodotironina) y la T4 (tiroxina), siendo esta última la forma mayoritaria secretada por el tiroides, aunque la T3 es la más activa ya que tiene una afinidad mayor por los receptores de hormonas tiroideas (TRs) (Pascual y Aranda 2013). Las hormonas circulantes entran en las células a través de transportadores, entre los que destacan los monocarboxilados dependientes de ATP como el MCT8 o el MCT10 y los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs) (Visser *et al* 2011).

Ya que la T3 es la forma más activa pero se secreta en menor cantidad, la T4 tiene como principal función servir como precursor de la T3 mediante la desiodación en la posición 5' del anillo externo. Esta acción, que ocurre en los tejidos periféricos, la llevan a cabo las enzimas desiodasas (DIO) (Yen 2001). Existen tres tipos de desiodasas, que son selenoproteínas. La DIO1 y la DIO2 catalizan la conversión de T4 a T3 en los tejidos diana, incrementando así los niveles intracelulares de la hormona activa. En cambio, la DIO3 ejerce el efecto contrario ya que disminuye los niveles de hormona activa catalizando la conversión de T4 y T3 a la forma inactiva rT3 (T3 reversa) y T2, respectivamente (Dumitrescu *et al* 2005, St Germain *et al* 2009). Por ello, la expresión y la distribución de las desiodasas juegan un papel muy importante en la acción de las hormonas tiroideas regulando la cantidad de hormona activa que va a alcanzar el receptor en tejidos y momentos específicos durante el desarrollo y la edad adulta (Gereben *et al* 2008).

### 1.2. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas

Aunque se ha postulado la existencia de un mecanismo de acción extra-genómico de las hormonas tiroideas iniciado en la membrana celular (Cheng *et al* 2010), su modo de acción por excelencia es a través de los receptores nucleares de hormonas tiroideas (TRs) que actúan como factores de transcripción a través de su unión, generalmente con otro receptor nuclear, el receptor X de retinoides (RXR), a los denominados elementos de respuesta a hormonas (TREs). Estos elementos son cortas secuencias de ADN formadas por palíndromes, palíndromes invertidos o repeticiones directas de la secuencia consenso AGGTCA o AGAACA espaciadas por un número variable de nucleótidos, que se encuentran localizadas en las regiones reguladoras de sus genes diana (Beato *et al* 1995). Los efectos de los receptores sobre la transcripción están mediados por el reclutamiento de correguladores: coactivadores y correpresores.

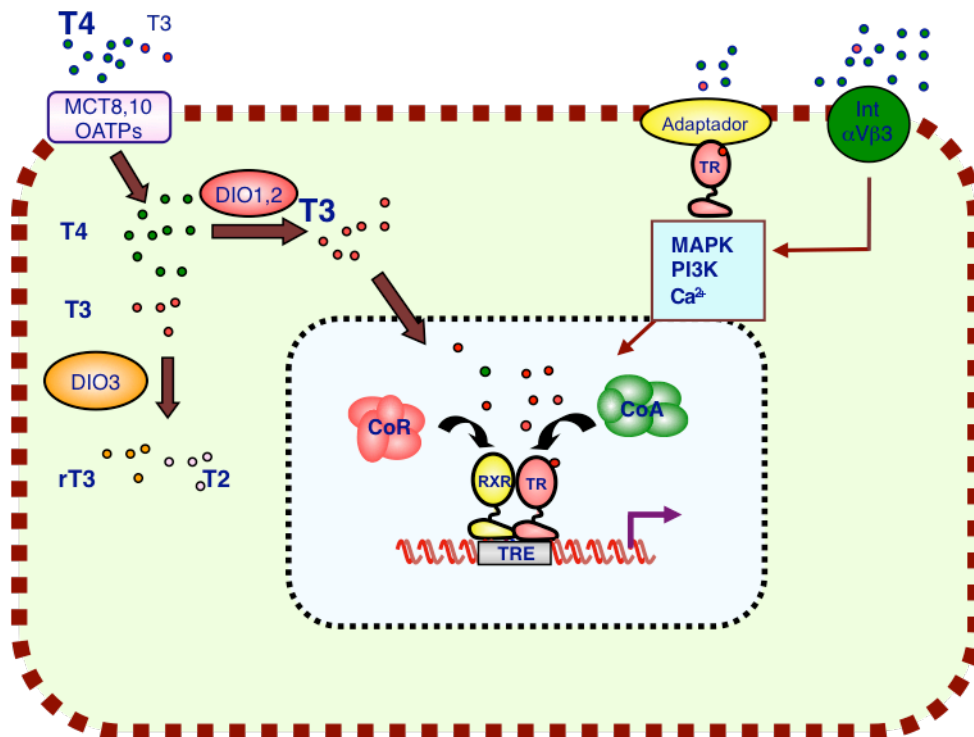
Los TRs en ausencia de ligando pueden actuar como fuertes represores constitutivos cuando se unen a los TREs de regulación positiva. Esto se debe a que los TRs interaccionan con correpresores como NCoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) o SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors*). Estos correpresores sirven como plataforma para reclutar grandes complejos represores que contienen, entre otros componentes, desacetilasas de histonas (HDACs). La desacetilación de las histonas promueve la compactación de la cromatina siendo, de este modo, el gen al que se une el receptor inaccesible para la maquinaria transcripcional y causando así su silenciamiento. La unión de la hormona induce un cambio conformacional en el receptor que permite la liberación de los correpresores y el reclutamiento de múltiples complejos coactivadores de forma secuencial (Moras y Gronemeyer 1998). Algunos de estos coactivadores forman parte de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, otros promueven cambios post-traduccionales de las colas de las histonas como la acetilación o la metilación de argininas, causando la descompactación de la cromatina, y finalmente otros interaccionan con la holoenzima de la ARN Polimerasa II, reclutando así la polimerasa al promotor y estimulando la transcripción (Aranda *et al* 2013).

Los TRs también pueden mediar la represión génica de un modo dependiente de ligando. En algunos casos, esta represión se debe a una inhibición pasiva debido a la competición con otros transactivadores por los sitios de unión del ADN o bien por la formación de heterodímeros transcripcionalmente inactivos. En otros casos existen TREs negativos que unen receptores y median una represión activa en presencia de ligando. Se han identificado este tipo de elementos, entre otros, en los genes del TSH y el TRH (Bodenner *et al* 1991). En estos elementos negativos, generalmente, el receptor vacío estimula la transcripción y la unión del ligando revierte dicha

activación. La posición del TRE negativo en el gen parece ser importante para su regulación. Habitualmente, los TREs negativos se localizan muy próximos al sitio de inicio de transcripción, algunos se sitúan por debajo de la caja TATA (Belandia *et al* 1998, Pérez-Juste *et al* 2000, Saatcioglu *et al* 1993) y en algunas ocasiones, están presentes en la región 3' no traducida del gen (Bigler y Eisenman 1995).

Los receptores nucleares también pueden regular la expresión de genes que no contienen TREs mediante una interferencia positiva o negativa con la actividad de otros factores de transcripción o rutas de señalización. Este mecanismo generalmente se denomina como “crosstalk” transcripcional (Aranda y Pascual 2001). En este caso, los receptores no se unen directamente a las regiones del ADN que reconocen esos factores de transcripción, sino que lo pueden hacer de forma indirecta mediante interacciones proteína-proteína con dichos factores o con sus coreguladores. De este modo, en nuestro laboratorio se ha descrito que los TRs pueden antagonizar la transcripción de genes que contienen elementos de unión de AP-1 (Perez *et al* 1994, Perez *et al* 1993), CREB (Méndez-Pertuz *et al* 2003, Sanchez-Pacheco *et al* 1995) o NF- $\kappa$ B (Chiloeches *et al* 2008, Lasa *et al* 2010) sin unirse a estas regiones. Este tipo de interacción funcional entre el receptor y diferentes factores de transcripción se ha observado con otros receptores nucleares (Pascual *et al* 2006) y se ha demostrado que es crucial para la regulación de muchas funciones celulares (Bosscher *et al* 2003, Rosenfeld *et al* 2006).

Además, como se había señalado, las THs pueden mediar acciones rápidas, denominadas “extra-genómicas” o “no-genómicas”. Estas respuestas podrían estar mediadas por una fracción de los TRs que se encontraría asociada a la membrana o uniéndose a un presunto receptor en la membrana celular, como la integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3, acoplado a un segundo mensajero encargado de generar la respuesta adecuada (Cheng *et al* 2010). En la figura 1 se muestra un esquema general del principal mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.



**Figura 1. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.** La T4 y la T3 entran a la célula a través de proteínas transportadoras. Una vez dentro, las desiodasas 1 y 2 (DIO1,2) convierten la T4 en T3. La DIO3 produce rT3 y T2 a partir de la T4 y T3, respectivamente. La T3 se une en el núcleo a los TRs que están unidos a los elementos TRE formando, generalmente, heterodímeros con el RXR. La actividad transcripcional viene regulada por un intercambio de los complejos de correpresores y coactivadores. La hormona también se podría unir a una subpoblación de receptores situados fuera del núcleo o a otro presunto receptor como la integrina  $\alpha\beta3$  produciendo lo que se denomina “efectos no-genómicos”.

## 2. Los Receptores de las Hormonas tiroideas

### 2.1. Isoformas de los THR

Como ya hemos visto, la acción de las hormonas tiroideas está mediada principalmente a través de su unión a los receptores de hormonas tiroideas. Los TRs están codificados por dos genes, *TRα* y *TRβ*, localizados, en el caso de humanos, en los cromosomas 17 y 3, respectivamente. A partir de los transcritos primarios de estos genes se generan las distintas isoformas de los receptores (Lazar 1993).

El gen *TRα* es el homólogo celular del oncogén *v-erb-a* del virus de la eritroblastosis aviar y codifica para varias isoformas del receptor. El TRα1 y TRα2 son las principales isoformas y se producen por procesamiento alternativo del gen *TRα*, difiriendo entre ellas en el carboxilo terminal. El TRα2 no une ligando y se comporta como un dominante negativo del TRα1 (Flamant

*et al* 2006, Lazar 1993). Recientemente se ha descrito una isoforma del TR $\alpha$ 1 de 30 kD (p30 TR $\alpha$ 1) que está unido a la membrana citoplasmática y parece jugar un papel importante en las acciones “no-genómicas” (Kalyanaraman *et al* 2014).

El gen TR $\beta$ , a partir de diferentes puntos de inicio de la transcripción, da lugar a las dos principales isoformas TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2, con diferentes regiones amino terminales, pero ambas capaces de unir T3. Otras isoformas minoritarias son el TR $\beta$ 3 y la forma truncada  $\Delta$ TR $\beta$ 3. Esta última se comporta como un dominante negativo que une T3 con alta afinidad pero no se une al ADN (Refetoff y Dumitrescu 2007, Williams 2000).

La expresión diferencial de las diferentes isoformas en los tejidos constituye un importante nivel de regulación de la señalización por los TRs. El TR $\alpha$ 1 presenta una expresión bastante ubicua y es el receptor predominante en cerebro, músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo marrón e intestino (Mitsubishi *et al* 1988, Plateroti *et al* 2007, Stoykov *et al* 2006), mientras que el TR $\alpha$ 2 se expresa de forma mayoritaria en el cerebro (Mitsubishi *et al* 1988, Mitsubishi y Nikodem 1989). El TR $\beta$ 1 es la isoforma que tiene una distribución más generalizada en el organismo encontrándose altos niveles de expresión en hígado y riñón (Hodin *et al* 1989), mientras que el TR $\beta$ 2 se expresa exclusivamente en la glándula hipofisaria, hipotálamo y retina (Cook *et al* 1992, Hodin *et al* 1989, Lazar 1993).

La posibilidad de que las isoformas de los TRs pudiesen mediar acciones específicas se ha visto respaldada por los estudios con animales que presentan inactivación génica, *knock-out* (KO), de alguna de las isoformas de los TRs, que muestran diferentes fenotipos. La delección del TR $\alpha$ 1 produce una reducción de la temperatura corporal y una disfunción en el ritmo cardíaco y la contractilidad del corazón (Wikström *et al* 1998), mientras que los ratones TR $\beta$  KO presentan el eje hipófisis-tiroides alterado y defectos en el oído interno y en el desarrollo de la retina (Forrest y Vennström 2000). Por otra parte, la supervivencia y el desarrollo postnatal de los ratones que carecen del TR $\alpha$ 1 y del TR $\alpha$ 2 se ve fuertemente comprometida (Fraichard *et al* 1997). Sin embargo, los ratones doble KO para TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$ , sorprendentemente, sobreviven, indicando que estas isoformas no son esenciales para la viabilidad (Göthe *et al* 1999). Estos ratones presentan defectos en los huesos, un crecimiento anormal y una disfunción severa del eje hipófisis-tiroides. Las isoformas TR $\alpha$  y TR $\beta$  pueden tener funciones que se solapan en determinados órganos como la piel, ya que los ratones con una delección para una de las isoformas presenta un defecto proliferativo, pero no tan agudo como el encontrado en los dobles KO (Contreras-Jurado *et al* 2011, García-Serrano *et al* 2011). Todos estos datos indican que el TR $\alpha$ 1 y el TR $\beta$  pueden sustituirse entre ellas para algunas funciones pero también median funciones específicas.



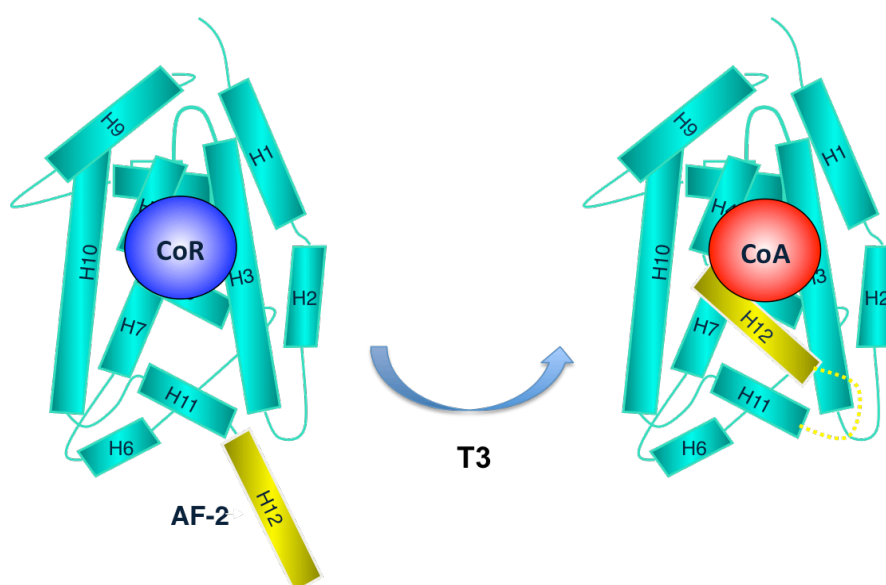
### 2.2. Estructura de los receptores de hormonas tiroideas

Tanto los TRs como la mayoría de los receptores nucleares (NRs) presentan una estructura modular con diferentes regiones que corresponden con dominios autónomos y funcionales que pueden ser intercambiados con los de otros NRs sin perder la funcionalidad (Aranda y Pascual 2001). Un NR típico consiste en una región N-terminal variable (A/B), un dominio conservado de unión a DNA (DBD) o región C, una región bisagra D, y una región conservada E que contiene el dominio de unión a ligando (LBD).

El dominio A/B de los NRs es una región variable en longitud y secuencia que se localiza en el extremo amino-terminal y presenta un dominio AF-1. Este dominio tiene función de activación transcripcional independiente de ligando. Por diferentes procesos de procesamiento alternativo y por el uso de diferentes regiones promotoras y sitios de inicio de transcripción, se generan diferentes tipos de estos dominios, lo que al final da lugar a la generación de diferentes isoformas. Por ejemplo, TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2 presentan los mismos dominios LBD y DBD pero, en cambio, la región A/B es diferente en ambos receptores. El DBD es el dominio más conservado dentro de los NRs y confiere al TR la capacidad de reconocer y unirse con alta afinidad a las secuencias TREs. Este dominio está compuesto por dos “dedos” de zinc. Los aminoácidos necesarios para el reconocimiento de los TREs están situados en la base del primer dedo en una región denominada “caja P” y los implicados en la dimerización se encuentran en el segundo dedo, en la denominada “caja D” (Rastinejad *et al* 1995). La región D o bisagra, que se encuentra entre el DBD y el LBD, no es un dominio bien conservado entre los diferentes receptores y su función es permitir la rotación del DBD con respecto al LBD. El dominio D en los TRs contiene la señal de localización nuclear, así como residuos cuya mutación impide la interacción con correpresores. Además, esta región se asocia fuertemente con el LBD pero solo en presencia del ligando o de correpresores, ejerciendo un efecto estabilizador sobre la estructura del receptor (Pissios *et al* 2000).

La región E o LBD presenta múltiples funciones. Es responsable de la unión del ligando y de la transactivación dependiente de ligando, mediada esta última por el denominado dominio AF-2 que se encuentra en el extremo carboxilo terminal. El LBD además media la homo- y heterodimerización de los receptores (Forman y Samuels 1990). El dominio LBD está constituido por 12 hélices  $\alpha$  (H1-H12). Las hélices forman una cavidad hidrofóbica o “bolsillo” que acoge al ligando (Moras y Gronemeyer 1998). La unión del ligando conlleva un importante cambio conformacional de la estructura del receptor, que conduce a la formación de una estructura más compacta en la que destaca la recolocación de la hélice 12 (que contiene el dominio AF-2) hacia una posición que cierra la cavidad en la que se encuentra el ligando. Además cabe destacar una región que engloba

la mitad del extremo C terminal de la hélice 3 y la hélice 4 cuya mutación no afecta a la unión del ligando ni a la dimerización pero si a la transactivación dependiente de ligando. Concretamente, una lisina altamente conservada en el carboxilo terminal de la hélice 3 es importante para la actividad transcripcional no solo del TR sino de la mayoría de los receptores nucleares (Aranda y Pascual 2001). El cambio conformacional que ocurre en presencia de ligando conduce a la formación de un surco hidrofóbico que permite el reclutamiento de coactivadores que interaccionan tanto con un glutámico conservado en la hélice 12 como con la lisina de la hélice 3. En la figura 2 se puede ver un dibujo esquemático de los cambios estructurales que se producen en el dominio LBD al unirse el ligando.



**Figura 2. Dibujo esquemático del dominio LBD en el TR en ausencia y presencia de la hormona.** Las hélices  $\alpha$  están numeradas de la 1 a la 12. Se aprecia la diferente posición de la región carboxilo terminal de la hélice 12 que contiene el dominio AF-2, cuya posición cambia en presencia o ausencia de ligando permitiendo el intercambio de correpresores y coactivadores.

### 3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )

La importancia del TGF $\beta$  queda reflejada en sus efectos pleiotrópicos, que incluyen desde la regulación de numerosos procesos fisiológicos como la proliferación, diferenciación, morfogénesis, homeostasis y regeneración tisular hasta su implicación en el desarrollo de patologías severas como el cáncer, enfermedades autoinmunes o fibrosis. Los efectos de esta citoquina pueden ser muy diferentes, incluso opuestos, dependiendo del tipo celular y de las

condiciones fisiológicas (Massagué 2012).

La identificación de los miembros de la familia del TGF $\beta$  comenzó en 1985 con la caracterización del ADN complementario que codifica para el TGF $\beta$ 1 (Derynck *et al* 1985). A partir de ahí, se fueron identificando subsecuentemente polipéptidos estructuralmente similares al TGF $\beta$ 1 que fueron formando parte de la familia del TGF $\beta$ . Hoy en día se conocen 33 miembros en humanos. Esta superfamilia incluye tres isoformas del TGF $\beta$ , activinas, proteínas Nodal, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) (Morikawa *et al* 2016).

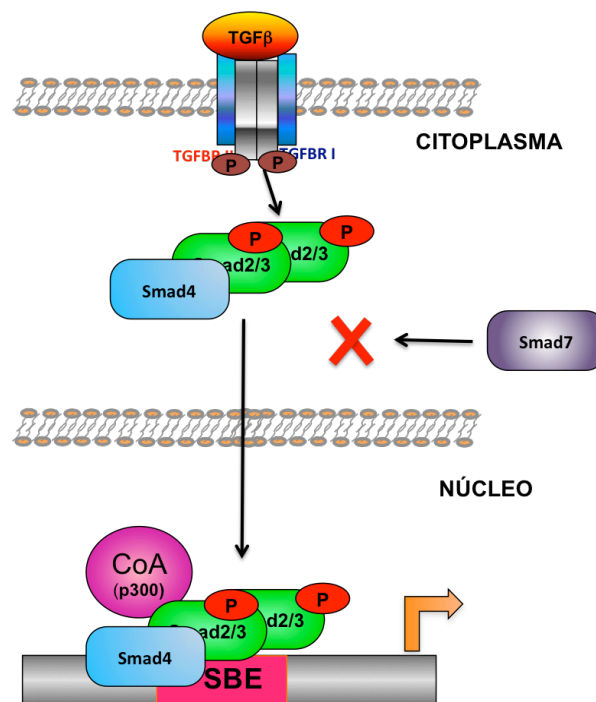
En contraste con la cantidad de ligandos de esta superfamilia, existen pocos receptores y efectores. Se han descrito tres tipos de receptores del TGF $\beta$  (TR $\beta$ ): TR $\beta$  I, II y III, incluyéndose a su vez siete tipos en el primero, cinco en el segundo y dos en el tercero. Los receptores TR $\beta$  I y II, que son glicoproteínas transmembrana con un dominio serina-treonina quinasa en la parte intracelular, son los que van a transmitir la señal al producirse la unión del ligando (Attisano y Wrana 1996). Los TR $\beta$  III, entre los que se encuentra la endoglina y el betaglicano, son también proteínas transmembrana pero no contienen una secuencia de señalización en su corto dominio intracelular (Attisano *et al* 1994).

En cuanto a los efectores de la vía, se identificó en primer lugar la proteína Mad en *Drosophila* (Raftery *et al* 1995, Sekelsky *et al* 1995). En *C. elegans*, fueron identificadas las proteínas Sma, que eran estructuralmente similares a las Mad (Savage *et al* 1996). En humanos se acuñó el nombre de SMAD al identificar el SMAD1 con una secuencia similar a las proteínas Mad y Sma (Liu *et al* 1996).

### 3.1. Mecanismo de acción del TGF $\beta$

El TGF $\beta$  se secreta como un polipéptido homodimérico latente inactivo, que se encuentra unido al péptido asociado de latencia (LAP), un propéptido del TGF $\beta$ , formando el complejo latente pequeño (Gentry *et al* 1987), al que normalmente se une otra molécula conocida como proteína de unión al TGF $\beta$  latente (LTBP) (Kanzaki *et al* 1990), formando el complejo latente grande. La forma madura y activa es el resultado de la escisión proteolítica del complejo latente. La unión del ligando maduro al receptor ensambla el complejo formado por dos receptores de tipo I y dos de tipo II. El receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I que es el que va a transducir la señal fosforilando los residuos de serina en el extremo C-terminal de las Smads

reguladas por el receptor (R-Smads). Como consecuencia de la unión de los ligandos TGF $\beta$ , proteína Nodal o activina se van a fosforilar la Smad2 y la Smad3, mientras que BMP o GDF causan la fosforilación de la Smad1, la Smad5 y la Smad8. Una vez fosforiladas las R-Smads oligomerizan con la Smad mediadora común (Co-Smad), Smad4, formando trímeros (dos R-Smads y una Co-Smad), que son la unidad funcional principal. Estos complejos se translocan al núcleo, donde, junto a otros cofactores nucleares, van a regular la transcripción de sus genes diana uniéndose a regiones concretas de sus regiones reguladoras denominadas elementos de unión a Smad (SBEs) (Shi y Massagué 2003).



**Figura 3. Vía canónica del TGF $\beta$ .** La unión del factor de crecimiento a su receptor induce la fosforilación por parte de éste de los factores de transcripción Smad2 y Smad3, a los que se une el mediador común Smad4. Este complejo se transloca al núcleo donde se une a los elementos de unión a Smad (SBE). Se produce el reclutamiento de coactivadores permitiendo la transcripción de los genes diana. Uno de estos genes es la Smad inhibitoria Smad7 que está implicada en la retroalimentación negativa de la vía.

El TGF $\beta$  también activa rutas que no dependen de los factores de transcripción Smads, como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) o la de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta señalización además puede, a su vez, regular la ruta canónica de las Smads (Massagué 2012).

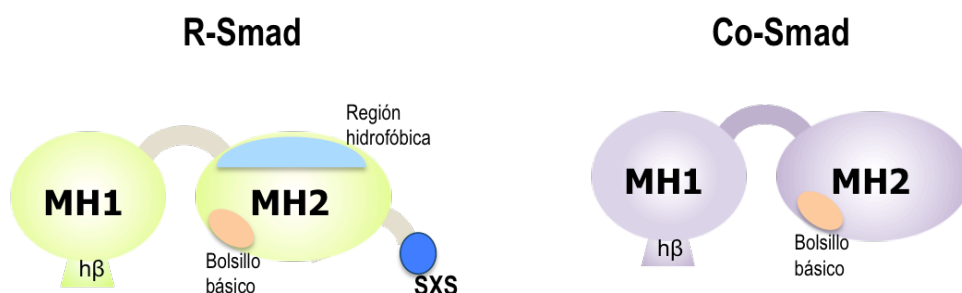
### 3.2. Factores de transcripción Smad

#### 3.2.1. Estructura de las Smads

Las Smads son proteínas de unos 500 aminoácidos en las que se diferencian dos dominios globulares altamente conservados (el dominio amino terminal MH1 y el dominio carboxilo terminal MH2) unidos por una región pobremente conservada. Estos dominios carecen de actividad enzimática intrínseca, pero controlan las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN (Wrana *et al* 2000).

El dominio MH1 está altamente conservado en todas las R-Smad y en la Co-Smad, pero no en las Smad inhibitorias (I-Smads) Smad6 y 7. La unión al ADN de las R-Smads y Co-Smad se produce a través de este dominio, gracias a una estructura de horquilla  $\beta$ , excepto en el caso de la Smad2, cuya forma más abundante contiene un inserto que impide la unión a ADN (Massagué *et al* 2005). Como ya se ha mencionado, las Smads se unen a los denominados elementos de unión a Smad (SBEs). La secuencia de estas regiones está compuesta principalmente por cuatro bases: 5'-GTCT-3' o su complementaria 5'-AGAC-3'. En algunas ocasiones contienen alguna base extra: 5'-CAGAC-3' (Shi *et al* 1998).

El dominio MH2 es uno de los más versátiles en cuanto a interacción con proteínas en la transducción de la señal. Parece que media la unión con ciertas proteínas como los receptores de tipo I, o la proteína SARA (anclaje de las Smads para activación del receptor) y varias proteínas nucleares como FOXH1, CBP, TGIF y Ski que van a actuar como coactivadores o corepresores (Wrana *et al* 2000). En este dominio se produce la fosforilación de las R-Smads, concretamente en las serinas de un motivo altamente conservado en el extremo carboxilo terminal, SXS. Este dominio media la asociación de las R-Smads con los receptores de tipo I y con Smad4. En el caso de Smad4 se precisa la presencia de este dominio para que las Smad1 y 2 activen la transcripción (Massagué 1998).



**Figura 4. Elementos estructurales de la R-Smad y la Co-Smad.** Las proteínas Smad contienen dos dominios globulares conservados (MH1 y MH2) y una región de unión variable. El dominio MH1 se caracteriza por tener una estructura de horquilla  $\beta$  ( $h\beta$ ) para la unión a ADN. El dominio MH2 contiene un bolsillo básico para la interacción con los receptores tipo I activados en el caso de las R-Smads, y tanto en las R-Smads como en la Co-Smad para la interacción con el dominio pSXS de las R-Smads. En la superficie del dominio MH2 de las R-Smads existe una región hidrofóbica que sirve como sitio para múltiples interacciones.

### 3.2.2. Tipos de Smads

Existen tres tipos de Smad que se describen a continuación:

Smads reguladas por el receptor (R-Smads): incluye las Smad1, 2, 3, 5 y 8. Son diana directa de los receptores tipo I y son fosforiladas en la secuencia SXS carboxilo terminal. Para que se produzca su reclutamiento hacia la membrana, se precisa la actuación de otra proteína: SARA o moléculas similares en el caso de BMP (Wrana *et al* 2000).

Smad mediadora común (Co-Smads): forma los complejos triméricos descritos con las R-Smads activadas, que luego se van a translocar al núcleo. En este grupo se incluye la Smad4 (Schiffer *et al* 2000). Su principal función es participar en la regulación de la transcripción más que transmitir la señal (Liu *et al* 1997).

Smads inhibitorias (I-Smads): incluyen la Smad6 y la 7. La Smad6 inhibe principalmente la señalización por BMP y parcialmente la del TGF $\beta$  cuando está sobreexpresada. Por el contrario, la Smad7 inhibe la señalización por TGF $\beta$ /activinas y, cuando está sobreexpresada, también la de BMP. La Smad7 antagoniza la señalización mediante la interacción con el complejo de receptores, específicamente los receptores tipo I, evitando así la fosforilación de las R-Smad (Nakao *et al* 1997b). Parece que en su estado basal se encuentra en el núcleo y que se transloca al citoplasma por la estimulación con TGF $\beta$  (Itoh *et al* 1998).

### 3.2.3. Ciclo de señalización de las Smads

En estado basal, existe un intercambio de las Smads entre el núcleo y el citoplasma vía contacto con nucleoporinas (Xu *et al* 2002). Sin embargo, en el caso de las Smads activadas por el receptor se requieren factores para la importación y exportación nuclear. Los complejos oligoméricos de R-Smads fosforiladas y Smad4, en el núcleo, interaccionan con otros factores de unión a ADN para lograr una alta afinidad y especificidad por sus genes diana. Esta interacción requiere que estén presentes elementos de ADN adecuados y a la distancia y orientación correcta

en los promotores de estos genes, de este modo la interacción es altamente selectiva. (Massagué *et al* 2005, Mullen *et al* 2011).

Como en el caso de los receptores nucleares, los factores Smad pueden tanto activar como reprimir la transcripción. La activación transcripcional por las Smads implica el reclutamiento de histonas acetil transferasas (HATs), como p300 y CBP, para remodelar la cromatina y estimular la transcripción. La inhibición de la expresión génica por los factores Smad depende, sin embargo, de su unión a otros factores como TGIF1 (Factor de interacción con 5'-TG-3') y TGIF2 que reclutan histonas desacetilasas (HDACs) (Massagué 2012), que, como se ha mencionado, van a producir la compactación de la cromatina y el silenciamiento génico.

La expresión del gen de la Smad inhibitoria *Smad7* es estimulada por TGF $\beta$ , de hecho su gen tiene elementos SBE en el promotor (Denissova *et al* 2000). Esta Smad ejerce su efecto antagónico por dos vías, además de comportarse como un inhibidor competitivo de las R-Smads al unirse al receptor de TGF $\beta$ , también recluta ubiquitin ligasas como SMURF que poliubiquitinan el receptor para su degradación (Ebisawa *et al* 2001, Kavsak *et al* 2000).

Existen también otras formas de regulación de las Smads como la sumoilización, la ubiquitinización o la acetilación, pero la más importante es su fosforilación y desfosforilación (Heldin y Moustakas 2012). Una vez en el núcleo, la fosforilación de las R-Smads en el motivo SXS mediada por el receptor, puede ser revertida por fosfatasas como la PPM1, limitando la actividad de las mismas y provocando su exportación al citoplasma (Liu y Feng 2010). Concretamente las Smad2 y 3 son desfosforiladas por la fosfatasa PPM1A (Lin *et al* 2006).

#### 4. TGF $\beta$ y fibrosis

Las enfermedades fibróticas representan uno de los mayores grupos de patologías para las que no hay una terapia efectiva. Se considera generalmente que la fibrosis aparece como resultado de un fallo en la reparación de heridas (Leask 2004) y se caracteriza por una diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, que conduce a la deposición excesiva de matriz extracelular, principalmente de colágeno (Bataller y Brenner 2005, Hernandez-Gea y Friedman 2011).

El TGF $\beta$  se considera el principal factor pro-fibrogénico. Su papel fundamental en esta patología se puso en primer lugar de manifiesto cuando se vió que la inyección subcutánea de

TGFβ1 purificado inducía lesiones fibróticas en el lugar de la inyección (Roberts *et al* 1986). También se ha visto el desarrollo de fibrosis hepática en ratones transgénicos con sobreexpresión de TGFβ1 en el hígado (Clouthier *et al* 1997, Kanzler *et al* 1999, Sanderson *et al* 1995). En la misma línea se ha observado que la administración de anticuerpos contra el TGFβ o oligonucleótidos anti-sentido reducen la fibrosis renal, que la administración de receptor TβRII soluble es beneficioso en la fibrosis hepática e intestinal y que los anticuerpos para TGFβ previenen la fibrosis cutánea y pulmonar en un modelo de esclerodermia murino (Flanders y Burmester 2003).

La mayoría de los efectos fibrogénicos que resultan de una incrementada señalización por TGFβ se piensa que son mediados por la ruta canónica de las Smads ya que se ha visto que ratones que no expresan Smad3 son resistentes a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Zhao *et al* 2002) o a la fibrosis cutánea inducida por radiación (Flanders *et al* 2002) o por bleomicina (Lakos *et al* 2004). Estos ratones también son más resistentes a la deposición de colágeno en un modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (Schnabl *et al* 2001).

Los efectos profibróticos del TGFβ implican una combinación de mecanismos y tipos celulares, incluido un aumento en la infiltración y/o proliferación de los fibroblastos preexistentes, generación de miofibroblastos, aumento de la síntesis de matriz extracelular (ECM) e inhibición de la colagenolisis (Morikawa *et al* 2016).

#### **4.1. Fibrosis hepática**

La fibrosis hepática es el resultado de una respuesta de reparación de heridas por un daño hepático repetido (Friedman *et al* 2003). Tras un daño agudo, las células del parénquima se regeneran y reemplazan a las necróticas o apoptóticas. Este proceso se asocia con una respuesta inflamatoria y una deposición de colágeno. Si el daño persiste, finalmente la regeneración hepática falla y los hepatocitos son sustituidos por gran cantidad de ECM con el colágeno como principal componente (Bataller y Brenner 2005). La acumulación de ECM se debe tanto a un incremento de su síntesis como a un descenso de su degradación. Esta disminución en la degradación es debido a una menor actividad de las metaloproteasas (MMPs) encargadas de la degradación de la matriz por una sobreexpresión de sus inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) específicos (Arthur 2000).



Las células hepáticas estrelladas (HSCs) juegan un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática ya que son los principales productores de ECM en el hígado dañado (Gäbele *et al* 2003). En el hígado sano, las HSCs residen en los espacios de Disse y son el mayor almacenaje de vitamina A, pero tras un daño crónico, las HSCs se activan y se transdiferencian en miofibroblastos, adquiriendo propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas. Estas HSC activadas, que expresan el principal marcador de los miofibroblastos, la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y pierden sus acúmulos de retinoide (Brenner 2009), van a migrar al lugar donde se ha producido el daño y secretar grandes cantidades de ECM, así como regular su degradación (Bataller y Brenner 2005). Además de las HSCs, otros tipos celulares pueden tener potencial fibrogénico, como los fibroblastos de los espacios porta que pueden jugar un papel importante iniciando la deposición de colágeno en procesos fibrogénicos derivados de enfermedades hepáticas colestásicas (Kinnman y Housset 2002, Magness *et al* 2004).

Aunque las HSC son el tipo celular más importante en este proceso, todos los tipos celulares hepáticos sufren cambios. Los hepatocitos sufren apoptosis, las células epiteliales de los sinusoides pierden las fenestras. Los macrófagos residentes en el hígado, las llamadas células de Kupffer, se activan y producen citoquinas y quimioquinas, y los linfocitos infiltran el tejido dañado contribuyendo a la inflamación (Brenner 2009).

El TGF $\beta$  tiene también un papel esencial en la progresión de la enfermedad. En el hígado sano, sólo las células endoteliales de los sinusoides y las células de Kupffer expresan niveles relativamente altos de mRNA de TGF $\beta$ , pero en respuesta al daño, se induce su expresión también en las HSCs. El TGF $\beta$ , a su vez, induce la activación de las HSC promoviendo la deposición de la matriz extracelular e inhibiendo la degradación de la misma (Brenner 2009, Dewidar *et al* 2015). Para estudiar este proceso, la inducción de daño hepático mediante la administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en roedores ha sido ampliamente utilizado, ya que el CCl<sub>4</sub> afecta directamente a los hepatocitos. Una única dosis de CCl<sub>4</sub> provoca una necrosis centrolobulillar (Pierce *et al* 1987). Mientras que si la administración es prolongada lleva a la aparición de fibrosis hepática, cirrosis y finalmente hepatocarcinoma (Pérez Tamayo 1983).

### 4.2. Esclerodermia, fibrosis cutánea

La esclerodermia es una enfermedad autoinmune caracterizada por una inflamación seguida de una progresiva fibrosis, principalmente de la piel (Kissin y Korn 2003). Esta enfermedad también se caracteriza por una acumulación excesiva de colágeno tipo I y otros

componentes de la matriz extracelular. Los fibroblastos muestran un fenotipo activado (miofibroblastos) expresando  $\alpha$ -SMA y son, en un mayor grado, los responsables de la deposición exagerada de ECM (Kirk *et al* 1995). Como era de esperar, el TGF $\beta$ , que juega un papel esencial en los procesos fibróticos, es un factor clave en la esclerodermia, estimulando la síntesis de ECM por los fibroblastos, así como su migración y proliferación, previniendo su apoptosis e induciendo su diferenciación a miofibroblastos. La inyección subcutánea de bleomicina de forma repetida en ratones induce fibrosis cutánea mimetizando la esclerodermia (Mountz *et al* 1983, Yamamoto *et al* 1999). Este modelo ha sido ampliamente estudiado y se caracteriza por un aumento del grosor de la dermis con deposición de colágeno I, una disminución de la grasa subcutánea y una activación de los miofibroblastos, lo que se traduce en un aumento de expresión de  $\alpha$ -SMA (Akashi *et al* 2016).

Estos efectos del TGF $\beta$  en la fibrosis cutánea están también mediados esencialmente a través de la vía canónica de las Smads, ya que los ratones genéticamente modificados que no expresan Smad3 (Smad3<sup>-/-</sup>), cuando son sometidos a inyecciones repetidas de bleomicina, muestran una fibrosis atenuada, con menor deposición de colágeno y una expresión de  $\alpha$ -SMA reducida en comparación con los ratones controles (Lakos *et al* 2004).

## 5. Inflamación hepática y sus principales rutas de señalización

### 5.1 Hígado e inflamación

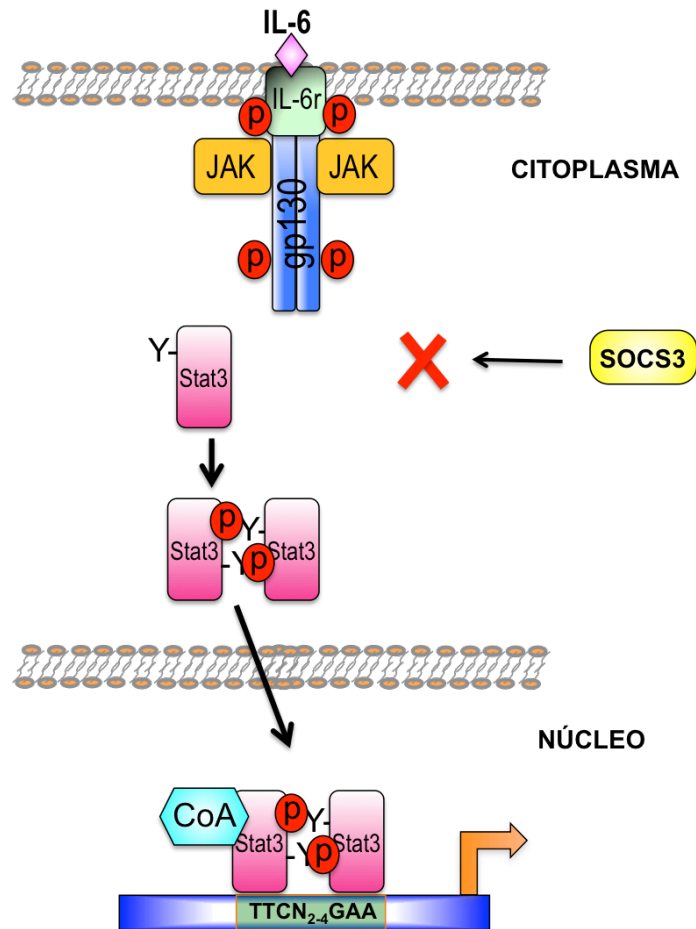
Como se ha mencionado, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de los procesos fibróticos (Bataller and Brenner 2005). El hígado juega un papel esencial en la inmunidad innata y adaptativa. En respuesta a señales patogénicas o inflamatorias, los hepatocitos van a responder secretando proteínas de la inmunidad innata. Puesto que muchas de estas proteínas se producen rápidamente tras la estimulación, se denominan proteínas de fase aguda (APP). La producción de estas APPs está regulada por varias citoquinas inflamatorias. Entre ellas, tienen un papel fundamental la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) que ejercen su acción a través de la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), respectivamente (Zhou *et al* 2015). Algunos de los genes diana son comunes para NF- $\kappa$ B y STAT3, ya que contienen sitios de unión para ambos factores de transcripción, existiendo además mecanismos de “cross-talk” entre ellos, tanto positivos como negativos (Bode *et al* 2012). Se considera a los hepatocitos como los principales efectores en la respuesta hepática a las diferentes citoquinas. Adicionalmente, los hepatocitos también expresan

citoquinas, en respuesta a determinados estímulos (Norris et al 2014), aunque los principales productores de citoquinas son los macrófagos. Estos forman una población muy heterogénea clasificados en función de su origen o diferenciación y liberan una elevada variedad de citoquinas y quimioquinas (Tacke and Zimmermann 2014). Las células de Kupffer, como ya hemos visto, son los macrófagos residentes en el hígado y estas células, junto con macrófagos circulantes procedentes de la médula ósea que infiltran el tejido, orquestan la respuesta inflamatoria hepática (Heymann and Tacke 2016).

Aunque la mayoría de los trabajos indican que las citoquinas IL-6 e IL-1 son los principales reguladores de las síntesis de las APPs, hay evidencias de que en su producción intervienen, de forma secundaria, otros factores y citoquinas por lo que su síntesis no depende solo de un factor sino de una variedad de ellos (Quinton et al 2009, Sander et al 2010). Dentro de las APPs más destacadas se encuentran la proteína reactiva C (CRP), la haptoglobina, la hepcidina, la proteína amiloide sérica A (SAA) y los fibrinógenos (Bode et al 2012).

### 5.2 IL-6 y Stat3

La señalización de la IL-6 está mediada por la unión de la citoquina a su receptor específico  $\alpha$  (IL-6r), que se une a su vez con un homodímero de la subunidad del receptor  $\beta$  transductor de señal, gp130. Este complejo activa a las Janus quinasas (JAKs) asociadas a la subunidad gp130, que fosforilan diferentes residuos tirosina del receptor IL-6r. Esta fosforilación promueve el reclutamiento de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), principalmente STAT1 y STAT3 (Heinrich *et al* 1998), siendo este último de mayor relevancia en procesos patológicos como el cáncer o la inflamación. La principal fosforilación de STAT3 tiene lugar en la Tyr705. Esta modificación induce su dimerización y su translocación al núcleo. Los dímeros de STAT3 se unen a sus elementos de respuesta específicos con la secuencia consenso TTCN<sub>2-4</sub>GAA, motivo palindrómico reconocido por todas las STATs (Ehret et al 2001), activando la transcripción de sus genes diana a través del reclutamiento de coactivadores con actividad HAT (Garbers *et al* 2015).



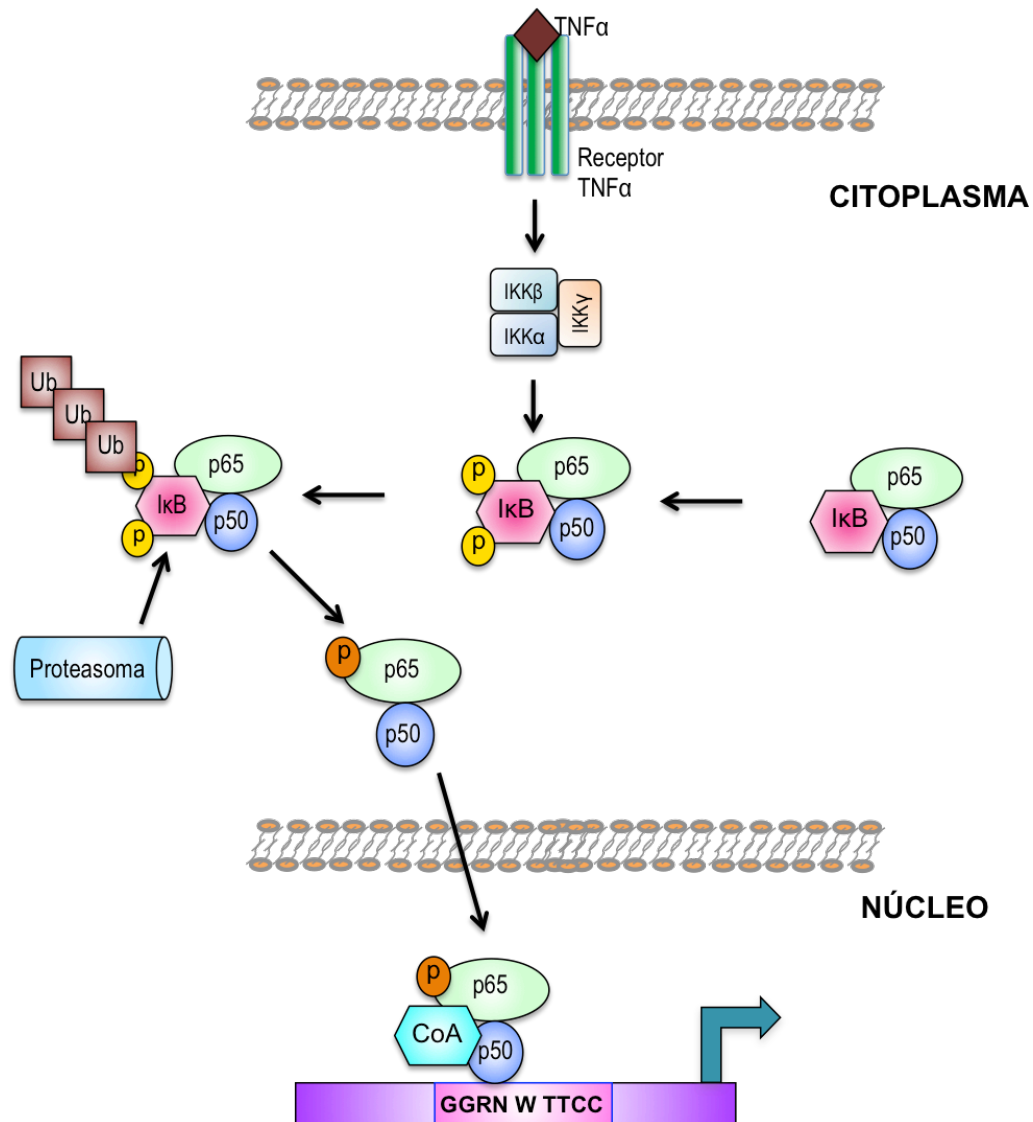
**Figura 5. Ruta IL-6/Stat3.** La IL-6 se une a su receptor soluble, IL-6r, que se une al homodímero formado por dos subunidades del receptor gp130, resultando en la activación de las Janus quinases (JAK). Esto lleva a la activación de STAT3 por la fosforilación de la tirosina (Y) 705, provocando su dimerización y translocación al núcleo donde se va a unir a sus elementos de respuesta de los genes diana, induciendo el reclutamiento de coactivadores y estimulando así la transcripción. SOCS3, cuya expresión es estimulada por STAT3, está implicado en la retroalimentación negativa de la ruta.

El principal regulador negativo de esta ruta es la proteína supresora de la señalización por citoquinas 3 (SOCS3), que es una diana directa de STAT3. SOCS3 se va a unir a la subunidad gp130 y también a interaccionar con las JAKs provocando el reclutamiento del complejo ubiquitin E3 ligasa con la subsecuente degradación del receptor. También puede unirse directamente a los dominios quinasa de las JAKs impidiendo la fosforilación de STAT3 (Babon *et al* 2014).

Además de la cascada JAK/STAT, las vías de las MAP quinases y la de la PI3 quinasa también son activadas por la IL-6. Esta activación se produce al ser fosforilado el residuo tirosina 759 de la subunidad gp130, lo que va a provocar un reclutamiento de la fosfatasa SHP2, que también está implicada en la inhibición de la activación de STAT. SHP2 estimula ambas rutas, la MAPK/ERK y la PI3 quinasa (Eulenfeld *et al* 2012).

### 5.3 TNF $\alpha$ y NF- $\kappa$ B

El factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) consiste en una familia de factores transcripcionales diméricos con un papel muy importante en la coordinación de las respuestas inflamatorias, en la inmunidad innata y adaptativa y en la diferenciación, proliferación y supervivencia celular de casi todos los organismos multicelulares (Gerondakis *et al* 2006, Hayden y Ghosh 2012, Hoffmann y Baltimore 2006, Vallabhapurapu y Karin 2009). Existen cinco miembros en la familia de proteínas NF- $\kappa$ B que pueden formar diferentes dímeros o monómeros, aunque no todos son activos. Estos son: NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100), RelA (p65), RelB y c-Rel (Ghosh *et al* 1998). El dímero predominante es el formado por p50 y p65. En células no estimuladas, la mayoría de los dímeros se encuentran en el citoplasma unidos a las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ / $\epsilon$ ). Sin embargo, en respuesta a un estímulo proinflamatorio como el TNF $\alpha$ , el complejo de I $\kappa$ B quinasa (IKK), compuesto por las subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y la subunidad reguladora IKK $\gamma$ , se activa fosforilando las proteínas I $\kappa$ B. Esta fosforilación induce la ubiquitinización y degradación de las proteínas I $\kappa$ B, permitiendo que los dímeros de NF- $\kappa$ B libres entren en el núcleo, se unan a sus elementos de respuesta y recluten coactivadores que permiten la activación de la transcripción de sus genes diana (He y Karin 2011). Los heterodímeros formados por p50/p65 y p50/c-Rel se unen a una secuencia consenso de 10 pares de bases de DNA en sus genes diana: 5'-GGRN W TTCC-3' (donde R representa una purina, N cualquier base, y W una adenina o timina). En los heterodímeros, la subunidad p50 se une al hemisito 5' compuesto por 5 pares de bases (5'-GGGRN-3'), mientras que las subunidades p65 y c-Rel se unen al hemisito 3' compuesto por 4 pares de bases (5'-TTCC-3') (Chen-Park *et al* 2002, Chen *et al* 1998).



**Figura 6. Esquema de la vía canónica de NF-κB.** Tras la unión del TNFα a su receptor, se induce la activación del complejo IKK que a su vez provoca la fosforilación de las IκB, lo que las lleva a su ubiquitinización y degradación en el proteasoma. Esto resulta en la liberación del heterodímero NF-κB compuesto por p65 y p50, que va a ser fosforilado translocándose posteriormente al núcleo, donde se unirá su región de respuesta de los genes diana promoviendo el reclutamiento de coactivadores permitiendo así la transcripción.

Dado el amplio espectro de las funciones biológicas de NF-κB, su actividad ha de ser controlada por mecanismos altamente regulados, por lo que la actividad transcripcional de p65 también es regulada por modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones y acetilaciones. Se ha visto que la actividad de NF-κB es positivamente regulada por la fosforilación de p65 en múltiples residuos de serina (por ejemplo, S276, S311, S468, S529 y S536) (Viatour *et al* 2005). Se han descrito muchas quinasas que median dichas fosforilaciones como PKAc, MSK1/2, PKCξ, CK2, Akt, GSK3β, CaMKIV, TBK1 y RSK1 (Chen y Greene 2004, Schmitz *et al* 2004). Además de la

## INTRODUCCIÓN

transducción canónica de la señal de NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , las IKKs también fosforilan p65 en la serina S536, situada en el dominio de transactivación, facilitando la importación nuclear y la actividad transcripcional de RelA independientemente de los efectos sobre I $\kappa$ B $\alpha$  (Sasaki *et al* 2005). Además, p65 puede sufrir acetilaciones por HATs como p300 y CBP en múltiples residuos. Por ejemplo la acetilación de p65 en las lisinas 310 y 221 disminuye su interacción con I $\kappa$ B $\alpha$  y potencia su unión al ADN y la actividad transcripcional (Chen y Greene 2003, Chen *et al* 2002, Kiernan *et al* 2003). El p65 acetilado es subsecuentemente desacetilado por las HDAC, como la HDAC3 (Kiernan *et al* 2003), que promueven su asociación con la I $\kappa$ B $\alpha$  nuevamente sintetizada, provocando la exportación nuclear de p65 y por tanto la finalización de las señal por NF- $\kappa$ B (Chen *et al* 2001).

Tanto la degradación de las I $\kappa$ Bs como la fosforilación de la serina S536 de p65 se utilizan ampliamente como índice de la activación de NF $\kappa$ B.

## OBJETIVOS

---



En este trabajo nos hemos propuesto estudiar el efecto de las hormonas tiroideas y de sus receptores sobre la ruta del TGF $\beta$  y el desarrollo de la fibrosis, en la que este factor de crecimiento juega un papel crucial, así como el estado de mediadores inflamatorios que son de gran importancia en esta patología.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Determinar el efecto de la hormona tiroidea T3 sobre la actividad de la ruta del TGF $\beta$ .
2. Estudiar los dominios de los TRs implicados en la represión de la transcripción dependiente de TGF $\beta$  por la T3.
3. Investigar el mecanismo molecular subyacente a este antagonismo.
4. Examinar el efecto de los TRs y de las hormonas tiroideas en el desarrollo de patologías fibróticas.
5. Analizar el efecto de los TRs y de las hormonas tiroideas en los procesos inflamatorios asociados a dichas patologías.
6. Estudiar en modelos celulares el efecto de la T3 sobre la señalización de dos de los principales mediadores inflamatorios, la IL-6 y el TNF $\alpha$ .

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. Líneas celulares

Las líneas celulares y los medios de cultivo utilizados en este trabajo han sido los siguientes:

**GH4C1:** células murinas de tumor hipofisario. Crecidas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)-HEPES suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL), 100 U/ml de penicilina (Gibco-BRL) y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-BRL).

**HeLa:** células humanas de adenocarcinoma. Crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**Hep3B:** células humanas de hepatocarcinoma. Crecidas en EMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina (Gibco-BRL), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**HepG2 y HepG2-TRβ:** células humanas de hepatocarcinoma. Ambas, las parentales y las que sobreexpresan el TRβ de forma estable fueron amablemente cedidas por el Dr. M. Privalsky (Chan y Privalsky 2009). Crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**MEFs:** fibroblastos embrionarios de ratón obtenidos a 13, 5 días post-coito según el protocolo descrito previamente (Palmero y Serrano 2001). Crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**Mv1Lu:** células epiteliales de pulmón de visón. Crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**N2aβ:** células murinas de neuroblastoma que expresan de forma estable el TRβ1. Crecidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**RAW264.7:** macrófagos murinos. Crecidos en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

Los experimentos con la hormona T3 (triiodotironina) se realizaron en suero fetal bovino (SFB) deplecionado de hormonas tiroideas (SFB -T3) mediante el tratamiento con la resina AG-1-

X8 (Bio-Rad). Salvo que se diga lo contrario, la T3 se utilizó a una concentración final de 5 nM y durante los tiempos indicados en cada caso. Las células se cambiaron a este medio libre de hormona al menos 18 horas antes y se cultivaron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad relativa.

## 2. Plásmidos

### 2.1. Plásmidos reporteros

**3xNF-κB-TK-Luc:** Este plásmido contiene tres repeticiones en tándem de los sitios de unión a NF-κB del gen *H-2k* bajo el control del promotor TK seguido del gen de la luciferasa (Lasa *et al* 2010).

**Gal4UAS-luc:** Gen reportero de la luciferasa bajo el control de la secuencia UAS (*upstream activator sequence*) del Gal4 (Addgene #64125).

**p15-luc:** Gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de p15, inducible por TGFβ (Addgene #15706).

**p3TP-lux:** Este plásmido contiene el promotor proximal de PAI-1 inducible por TGFβ, delante del gen de la luciferasa (Wrana *et al* 1992). Este plásmido ha sido amablemente cedido por la Dra. Pilar Santisteban.

**pRL-TK-Renilla:** Este plásmido expresa el gen testigo luciferasa de *Renilla reniformes* bajo el control del promotor de TK (Promega). Este vector ha sido amablemente cedido por el Dr. A. Baniahmad (Genetic Institute, Germany).

**pTATA-TK-Luc:** Este plásmido contiene cuatro copias del sitio consenso de unión a STAT bajo el control del promotor TK seguido del gen de la luciferasa (Don-Doncow *et al* 2014).

**pTK-DR4-luc:** Este plásmido expresa el gen reportero luciferasa bajo el control del promotor timidina quinasa (TK). En posición 5' del promotor TK, contiene el elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) compuesto por dos hemisitios separados por cuatro pares de bases (bp) (DR4). Este vector ha sido amablemente cedido por el Dr. A. Baniahmad (Genetic Institute, Germany).

**Smad7-luc:** Gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de Smad7, inducible por TGFβ (Seoane *et al* 2001).

## 2.2. Vectores de expresión

**Gal-SMAD3:** vector de expresión de SMAD3 fusionado con el dominio de unión a DNA de Gal4 (Addgene #12635).

**GalDBD:** vector de expresión del dominio de unión a DNA del Gal4 (Addgene #42500).

**pSG5:** vector vacío que contiene el promotor temprano del virus SV40 (Agilent).

**SMAD3 S/D:** Mutante de SMAD3 en el que las serinas 423 y 425 fueron cambiadas por ácido aspártico. Este vector de expresión está bajo el promotor CMV5 y fue generado por VectorBuilder y confirmado por secuenciación.

**SMAD3 S/E:** Mutante de SMAD3 en el que las serinas 423 y 425 fueron cambiadas por ácido glutámico. Este vector de expresión está bajo el promotor CMV5 y fue generado por VectorBuilder y confirmado por secuenciación.

**SMAD3-Flag:** este plásmido contiene el DNA codificante del gen de SMAD3 humano con el epítipo Flag bajo el promotor CMV5 (Costamagna *et al* 2004).

**SMAD4-HA:** vector de expresión del gen de SMAD4 unido al epítipo HA bajo el promotor CMV5 (Costamagna *et al* 2004).

**SMAD7-Flag:** este plásmido contiene el DNA codificante del gen de SMAD7 humano bajo el promotor CMV (Costamagna *et al* 2004).

**TR $\alpha$ :** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR $\alpha$ 1 de pollo (Sánchez-Pacheco y Aranda 2003) clonado en el pSG5.

**TR $\alpha$ -C51G:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\alpha$ 1 en el que se ha introducido la mutación C51G que impide la unión del receptor al ADN (Sánchez-Pacheco y Aranda 2003).

**pSG5-TR $\alpha$ -E401Q:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\alpha$ 1 con la mutación E401Q en la hélice 12 del LBD que impide el reclutamiento de coactivadores y la transcripción dependiente de T3 (Sánchez-Pacheco y Aranda 2003).

**pSG5-TR $\alpha$ -LBD:** este plásmido contiene el DNA codificante para el dominio LBD del TR $\alpha$ 1 (Palomino *et al* 1998).

**TR $\beta$ :** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR $\beta$ 1 humano clonado en pSG5 (García-Silva *et al* 2011).

**TR $\beta$  E452Q:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\beta$ 1 con la mutación E457Q en la hélice 12 del LBD que impide el reclutamiento de coactivadores y la transcripción dependiente de T3 (García-Silva *et al* 2011).

**pSG5-TR $\beta$  K288I:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\beta$ 1 con la mutación K288I en la hélice 3 del receptor (García-Silva *et al* 2011).

**pSG5-TR $\beta$  C102G:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\beta$ 1 en el que se ha introducido la mutación C102G que impide la unión del receptor al TRE (García-Silva *et al* 2011).

**TR $\beta$  GS120:** este plásmido contiene el ADN codificante del gen del TR $\beta$ 1 humano en el que se ha mutado la caja P (GS120) (García-Silva *et al* 2011), cambiando la especificidad de unión a elementos de respuesta a hormona tiroidea por especificidad de unión a elementos de respuesta a glucocorticoides (Shibusawa *et al* 2003).

**TR $\beta$ -Flag:** vector de expresión del receptor del TR $\beta$ 1 unido al epitopo Flag (Ying *et al* 2006), clonado en pSG5.

**TR $\beta$ -GFP:** Vector de expresión de TR $\beta$ 1 fusionado con GFP bajo el promotor CMV. Ha sido cedido amablemente por la Dra. S-Y Chen (Zhu *et al* 1998).

**TR $\beta$ 2A:** Mutante de TR $\beta$ 1 en el que se ha cambiado la lisina 184 y la arginina 185 por alaninas, obteniéndose un mutante en la señal de localización nuclear en el dominio D. Ha sido cedido amablemente por la Dra. S-Y Chen (Zhu *et al* 1998).

### 2.3. Vectores de expresión de proteínas de fusión

**pGEX-2TK-LP (pGEX-0):** vector vacío que contiene el epitopo GST (Addgene #11716).

**pGEX-SMAD2:** vector para la proteína de fusión entre GST y Smad2 (L+MH2) (Addgene #15730).

**pGEX- SMAD2 MH1:** vector para la proteína de fusión entre GST y el dominio Mad de homología 1(MH1) del factor SMAD2 (Seoane *et al* 2001).

**pGEX-SMAD3:** vector para la proteína de fusión entre GST y el factor SMAD3 (Y Zhang *et al* 1996).

**pGEX- SMAD3 MH1:** vector para la proteína de fusión entre GST y el dominio Mad de homología 1(MH1) del factor SMAD3 (Addgene #16493).

**pGEX-SMAD4:** vector para la proteína de fusión entre GST y el factor SMAD4 (Zhang *et al* 1996).

### 3. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

Todas las células fueron transfectadas con lipofectamina 2000 (InVitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En los ensayos de transfección transitoria las células fueron sembradas 18h antes en placas de 24 pocillos, en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino deplecionado de hormonas tiroideas mediante tratamiento con resina AG1-X8, sembrando el número óptimo para cada tipo celular determinado previamente. Se transfectaron 150 ng del gen reportero luciferasa y, cuando correspondía, las cantidades indicadas en cada caso de los vectores de expresión o la cantidad apropiada del correspondiente vector vacío. Como control interno de la eficiencia de transfección se transfectaron 50 ng del vector pRL-TK-Renilla (Promega). Tras la transfección, las células fueron incubadas durante 36 horas con T3 5 nM y, en función del experimento, cuando éste lo requiera, con TGF $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$  a 10 ng/ml durante las últimas 5 horas. En el caso de los mutantes de SMAD3 S/D y S/E solo se trató con T3 durante 24 horas. Las actividades luciferasa y renilla se determinaron utilizando el kit “Dual Luciferase Reporter Assay System” (Promega) en un luminómetro GLOMAX (Promega). La actividad luciferasa se normalizó por la actividad renilla. Los resultados representados para cada punto experimental se refieren a la actividad luciferasa/renilla relativa a la actividad obtenida en las células transfectadas con el vector vacío o sin tratar. En las figuras se representa la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado más la desviación estándar.

### 4. Extracción de proteínas y Western Blot

Los hígados y las pieles fueron homogenizados y las proteínas fueron extraídas con Buffer Ripa (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glicerol, 1 mM EGTA, 1% Triton-X100, 1% Deoxicolato Sódico y 0,1% SDS). Las células fueron lavadas con tampón fosfato (PBS) y posteriormente lisadas con el tampón de lisis con triple detergente (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% NP-40; 0,5% deoxicolato sódico). En todos los casos se añadieron cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche, Base, Suiza). Posteriormente, los lisados proteicos se mantuvieron en hielo durante un periodo de 15-20 minutos, tras lo cual se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se conservaron a -80°C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

hasta su análisis por *Western-blotting*. La concentración de proteína del extracto se evaluó en duplicados de las muestras con el BCA<sup>TM</sup> *Protein Assay Kit* (Pierce) y un lector de ELISA (VersaMax, Molecular Devices). Las proteínas se analizaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE, con diferentes porcentajes de acrilamida, en función del tamaño de la proteína a estudiar. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro. Las membranas se incubaron durante 1 hora a RT con solución de bloqueo (4% albúmina bovina sérica, BSA, Sigma en TBS-0,05% Tween-20 (TTBS) o 4% leche desnatada-TTBS) y a continuación se incubaron durante una noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron tres veces, 10 minutos, con TTBS y se incubaron a continuación 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido 1/10.000 en TTBS. Después se volvieron a lavar tres veces, 10 minutos, con TTBS. El revelado se realizó con el sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL, *Immun-Star<sup>TM</sup> HRP Luminol/Enhancer*, Bio-Rad), según las instrucciones del proveedor. Las imágenes se cuantificaron con el *software Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los anticuerpos utilizados se enumeran en la Tabla 1.

### 5. Ensayos de GST *pull-down*

#### 5.1. Purificación de proteínas fusionadas a GST

La cepa bacteriana BL-21 fue transformada con los plásmidos pGEX-0, pGEX-SMAD2, pGEX-SMAD3, pGEX-SMAD4 y pGEX-SMAD3MH1 y pGEX-SMAD2MH1. Se cultivaron 100 ml de estas bacterias hasta obtener una densidad óptica de 0,6 medida a 600 nm. En este momento, la expresión de la proteína fusionada a GST se indujo con 0,4 mM de IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosido). La inducción se realizó durante 2 horas. A continuación, las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una mezcla de PBS e inhibidores de proteasas. Posteriormente se añadió 0,5% del detergente Triton X-100. Las bacterias se sonicaron durante 4 ciclos de 15 segundos. Después, el lisado de bacterias se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó con 300 ml de PBS-glutation-Sepharosa 4B (Amersham-Biosciences) durante 1 h a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS. La elución de la proteína de fusión se realizó mediante sucesivas incubaciones de 15 min con 10 mM glutation. La cantidad de proteína recombinante se estimó por SDS-PAGE en comparación con cantidades conocidas de BSA.



### 5.2. Ensayo de interacción proteína-proteína con GST y proteínas traducidas *in vitro*

Los ADNc que codifican las proteínas TR $\beta$ , TR $\alpha$  y los mutantes en los distintos dominios están clonados, como ya se ha indicado, en el vector pSG5. Dicho vector contiene el promotor de SV40 para su expresión en eucariotas, así como el promotor T7 que permite la transcripción y la traducción *in vitro*. La transcripción y traducción *in vitro* se llevó a cabo utilizando 1  $\mu$ g del plásmido en un volumen final de 50  $\mu$ l, en presencia de [ $^{35}$ S] metionina y [ $^{35}$ S] cisteína, siguiendo las instrucciones del kit TNT de Promega.

Para los ensayos de *pull-down in vitro*, 10  $\mu$ l de la proteína marcada radiactivamente se incubaron con 25  $\mu$ l de las proteínas de fusión o las mismas cantidades de la proteína GST-0 como control. Las proteínas fueron inmovilizadas en la matriz de glutation sefarosa en el tampón IPAB (20 mM Hepes pH 7,9, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02% Triton X-100, 0,02 mg/ml BSA, 0,1 M PMSF, 10 mg/ml leupeptina y 10 mg/ml pepstatina). Donde se indica, se añadió una concentración de 1  $\mu$ M de T3 a la reacción de unión. Las proteínas unidas se analizaron por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida y autorradiografía.

### 5.3. Ensayo de interacción proteína-proteína con GST y extractos celulares

Células COS-1 fueron transfectadas con el vector de expresión de TR $\beta$ -Flag, tratadas con T3 50 nM durante 1 hora, y lisadas en el buffer NTEN (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las proteínas de fusión con GST (20  $\mu$ l) fueron equilibradas con la solución de lisis NTEN y se incubaron con 350  $\mu$ l de los extractos proteicos obtenidos de las células COS-1. Posteriormente las esferas de glutation sefarosa fueron lavadas tres veces con 1ml del buffer NTEN y resuspendidas en 35  $\mu$ l de tampón Laemmli 2X. Las interacciones fueron visualizadas por Western Blot.

## 6. Ensayos de Co-inmunoprecipitación

Se plaquearon las células en placas de 100 mm y se contranfectaron con 12  $\mu$ g de los vectores de expresión para TR $\beta$  etiquetado con Flag y 9  $\mu$ g de SMAD4 etiquetado con el epitopo HA. Las células se trataron con T3 50 nM durante 1 hora según correspondía y posteriormente fueron lisadas con el buffer previamente descrito para lisis de proteínas. Aproximadamente 700  $\mu$ g de los extractos totales fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-Flag o con su

correspondiente IgG control durante una noche a 4°C y después se incubaron con la proteína A/G Plus-Agarose (Sant Cruz) durante 1 hora. En otro experimento, se hizo una extracción diferencial de núcleo-citoplasma con el kit NE-PER (Thermo scientific) y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de forma independiente utilizando la misma metodología. Para la coimmunoprecipitación de proteínas endógenas, se usaron células GH4C1 que se trataron con 50 nM de T3 y/o 10 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo para SMAD2/3. En este caso, en vez de usarse la proteína A/G Plus se usaron Dynabeads (Life Technologies). En todos los casos los inmunocomplejos y las proteínas del extracto completo se analizaron mediante Western blot con anticuerpos para SMAD2/3, SMAD4 y TRβ.

### 7. Extracción de RNA y RT-PCR cuantitativa

Para la extracción de ARN total se utilizó el kit RNeasy Mini (Qiagen) para tejido y el reactivo *Trizol* (Sigma) para células, basado en el método del isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. La concentración de ARN se estimó en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 y las muestras fueron conservadas a -80°C en agua MilliQ. Para la síntesis de ADNc utilizamos el *SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System* de Invitrogen siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada reacción, empleamos 1 µg de ARN total tratado con DNasa I. El producto final de la reacción se llevó a un volumen final de 20 µl.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron utilizando el sistema basado en *Sybr Green (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX))* (Roche) en el termociclador Mx3500P de Stratagene. Para cada reacción empleamos 1 ó 2 µl de ADNc y una mezcla de reacción que contenía 0,3 µM de cada oligonucleótido, *FastStar Taq DNA polymerase*, tampón de reacción, dNTPs, SYBR Green y el fluorocromo ROX, en un volumen final de reacción de 10 µl. Las condiciones de PCR consistieron en una primera fase de desnaturalización de 95°C/10 min, seguida de 95°C/30 s para la desnaturalización, y 60°C/1 min para el anillamiento y elongación del producto durante cuarenta ciclos. A continuación se realizó la adquisición de la fluorescencia de los productos sometidos a un gradiente creciente de temperatura [95°C/1 min, gradiente (60°C-95°C)].

El análisis de los resultados se realizó mediante el software del termociclador y según el método  $C_t$  comparativo ( $DDC_t$ ), utilizando los valores de ARNm de GAPDH, 18S o L19 como control.

## 8. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

Para estos experimentos utilizamos las condiciones y los reactivos del *kit* proporcionado por UPSTATE. Las células ( $10 \times 10^6$ ) GH4C1 se sembraron en placas de 150 mm en medio con suero deplecionado de hormonas tiroideas y al día siguiente se trataron T3 (50 nM) y/o TGF $\beta$  (10 ng/ml) durante 1 hora. A continuación se fijaron con 1% formaldehído durante 15 minutos a 37°C. Las células se lavaron con PBS frío que contenía inhibidores de proteasas y se recogieron mediante raspado de la placa y centrifugación a 2.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El sedimento celular fue lisado con 300  $\mu$ l de tampón de lisis (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 2  $\mu$ g/ml pepstatina A y 2  $\mu$ g/ml leupeptina) durante 15 minutos a 0°C. La sonicación se realizó en un sonicador Bioruptor UCD-200TM (Diagenode, Liège, Bélgica), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada reacción de inmunoprecipitación se usaron un tercio de las células y las cantidades de anticuerpos que se detallan en la Tabla 1. El ADN inmunoprecipitado fue purificado mediante dos ciclos de fenol/cloroformo y precipitado durante una noche con etanol a -80°C. Los sedimentos se resuspendieron en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se amplificó el ADN mediante PCR con oligonucleótidos sintéticos diseñados específicamente para las diferentes áreas de los promotores correspondientes que se enumeran en la Tabla 3. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 2% TAE conteniendo el fluorocromo SYBR safe (Gibco-BRL). En las reacciones de PCR se incluyeron las muestras correspondientes al material de partida (*inputs*) de cada una de las condiciones experimentales, obtenidas tras la sonicación. Cuando se indica, el ADN inmunoprecipitado se amplificó y se estimó por RT-PCR cuantitativa. Los resultados se presentan normalizados con respecto a la fracción de inputs.

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar ensayos ChIP con las células Hep3B fue similar. En este caso se plaquearon  $3 \times 10^6$  células, se pretrató con T3 10 nM durante 36 horas en medio suplementado con 0.5% de suero deplecionado de hormonas tiroideas y posteriormente se añadió IL-6 (10 ng/ml) durante 2 horas.

## 9. Inmunofluorescencia

Para este tipo de ensayo empleamos portaobjetos de cristal con 8 pocillos *Nunc* (Thermo Scientific). Se sembraron 12.000-18.000 células/pocillo y se trataron con T3 5 nM durante 36 horas y con TGF $\beta$  (10 ng/ml) durante 1 hora. Las células se fijaron con metanol durante 5 minutos y tras lavar con PBS se bloquearon 2 horas con la solución de bloqueo (5% en PBS, 0,1% Triton). Se

incubaron con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo durante una noche a 4°C. Se utilizó una dilución 1/200 del anticuerpo anti-SMAD3. Después de 30 min de lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo se preparó en solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora en una cámara de humedad a temperatura ambiente. Finalmente, las células se incubaron 10 min con Dapi (Molecular Probes), se lavaron con PBS y los portaobjetos se montaron con cubreobjetos y *ProLong* (Molecular Probes). Las imágenes se capturaron con el microscopio de fluorescencia Nikon E90i utilizando en cada caso los filtros adecuados y el *software NES Elements* (Nikon).

## 10. Ensayos con animales

### 10.1. Modelos animales

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones se mantuvieron en unas condiciones libres de patógenos, con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y con agua y comida *ad libitum*.

Para el modelo de fibrosis hepática con CCl<sub>4</sub> se usaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad. El hipertiroidismo se obtuvo añadiendo T<sub>4</sub> (0,67 µg/100 g de peso) y T<sub>3</sub> (3,5 µg/100 g de peso) en el agua de bebida, siendo ésta renovada todos los días. Tanto estos animales como los controles eutiroideos fueron inyectados intraperitonealmente con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (50 µl/100 g de peso) o con la misma cantidad de vehículo (aceite de oliva). En el caso del estudio de daño agudo, los ratones recibieron una única inyección de CCl<sub>4</sub>, o de vehículo, 48 horas antes de su sacrificio. Para el modelo de daño crónico con desarrollo de fibrosis, las inyecciones se repitieron durante 4 semanas con una frecuencia de 3 días por semana y los animales se sacrificaron 72 horas después de la última inyección. El tratamiento con hormonas tiroideas se continuó durante todo el periodo.

Se usaron también hígados de ratones sin tratar de 18 meses de edad. Estos animales eran doble KO para los TRs (TRα1<sup>-/-</sup>/TRβ<sup>-/-</sup>) o WT (TRα1<sup>+/+</sup>/TRβ<sup>+/+</sup>) con el mismo fondo genético (Contreras-Jurado *et al* 2011).

Para el modelo de esclerodermia cutáneo, se usaron ratones de 3 meses de edad de la cepa CD1. A estos ratones también se les indujo hipertiroidismo añadiendo T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en el agua de bebida desde 7 días antes de empezar con el tratamiento con bleomicina. La bleomicina (Sigma) se disolvió en PBS (100 µl de una concentración de 200 µg/ml) y se inyectó de forma subcutánea en cuatro puntos diferentes del dorso afeitado de los ratones. Estas inyecciones de bleomicina, o del vehículo correspondiente (PBS), se llevaron a cabo en las mismas regiones 6 días a la semana

durante 24 días, tanto en los ratones tratados como no tratados con hormonas tiroideas.

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se cogió el suero y las muestras de hígado y de piel se congelaron en RNAlater (Ambion) para obtener RNA, se criocongelaron para extraer proteína o se fijaron con paraformaldehído y fueron embebidos en parafina para los análisis histológicos. En todos los experimentos los animales se distribuyeron de manera aleatoria entre los diferentes grupos. Los niveles de T4 y T3 se midieron mediante radioinmunoensayo tras la extracción y purificación del suero como se ha descrito previamente (Obregon *et al* 1979). Las hormonas marcadas con  $^{125}\text{I}$ -T4 e  $^{125}\text{I}$ -T3 con una actividad específica elevada, así como el suero anti-T3 y anti-T4, fueron amablemente cedidos por la Dra. M. J. Obregon.

### 10.2. Medida de la aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad AST se midió en 32  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:3 del suero de los diferentes animales con el test de Reflotron (Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 10.3. Histología, inmunohistoquímica y morfometría

Los hígados y la piel fueron fijados en 4% de formalina y embebidos en parafina. Se hicieron cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo. Los cortes de los tejidos se desparafinaron e hidrataron y se tiñeron con Hematoxilina, tricrómico de Masson o rojo Picrosirio, según el caso, usando los procedimientos estándares. Después se deshidrataron de nuevo y se montaron las preparaciones con Moviol.

Las áreas fibróticas de los hígados se midieron en los cortes teñidos con rojo Picrosirio usando el software *Image J* marcando un umbral de intensidad de rojo para la detección de colágeno. La estimación del grado de fibrosis se llevó a cabo usando el índice de Ishak, valorando cada animal según la escala descrita (Ishak *et al* 1995).

El grosor de la piel se cuantificó a partir de los cortes teñidos con tricrómico de Masson, que permite ver el músculo con tonalidades rojas y el colágeno verdoso. Se utilizó el software *Image J* para medir el área de tejido conectivo dérmico y el área ocupada por la hipodermis. Las cuantificaciones se hicieron de al menos 5 campos individuales cogidos al azar de 4 ó 6 ratones por grupo experimental.

La inmunohistoquímica de Colágeno I se realizó sobre los cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor desparafinados e hidratados. El desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo con un tampón citrato llevado hasta la ebullición en un microondas. A continuación se inhibió la actividad peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol durante 10 minutos. Las muestras fueron bloqueadas y permeabilizadas mediante la incubación con PBS/0,5% Tritón X-100 durante 30 minutos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó, en la solución de bloqueo, durante una noche a 4°C en cámara húmeda. La amplificación y el revelado se llevó a cabo con el kit ABC (Vectastain), empleando DAB (DAB Substrate kit). Los portaobjetos fueron montados con *DePex* (Serva) y cubreobjetos.

Todas las imágenes se obtuvieron usando la cámara Leica DC200 de alta resolución montada en el microscopio Olympus DMLB. Los cortes de las pieles teñidas con rojo Picrosirio se observaron también en el mismo microscopio equipado con un polarizador de luz.

### 11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS. El test Shapiro-Wilk se usó para comprobar que existía una distribución normal en los datos analizados y el test de Levene para evaluar la igualdad de las varianzas. Las diferencias estadísticas de los datos se determinaron aplicando un test t de Student no pareado y de dos colas cuando se comparaban dos grupos, o una prueba ANOVA con un test Bonferroni cuando se trataba de experimentos con mas de dos grupos experimentales. Las diferencias estadísticamente significativas se presentan en las figuras con asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ ). No se hicieron cálculos previos para determinar el tamaño de muestra ya que éste se elegía en base a otros procedimientos descritos en este campo. El número de muestras o animales se indica en las correspondientes leyendas de cada figura. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  S.D. o medias  $\pm$  S.E.M., según se indica.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia y proveedor</b>
<b>Colágeno</b>	1:100	Inmunohistoquímica	ab34710 (Abcam)
<b>Erk2</b>	1:20000	Western blot	sc-154 (Santa Cruz)
<b>Flag</b>	3 µg / 1:2000	CoIP/Western blot	F1804(Sigma-Aldrich)
<b>Fosfo-ERK</b>	1:1000	Western blot	sc-7383 (Santa Cruz)
<b>Fosfo-p65</b>	1:500	Western blot	3033 (Cell Signaling)
<b>Fosfo-Smad2 (Ser465/467)</b>	1:1000	Western blot	3101 (Cell Signaling)
<b>Fosfo-Smad3 (Ser423/425)</b>	1:1000	Western blot	9520 (Cell Signaling)
<b>Fosfo-STAT3 (Tyr705)</b>	1:1000	Western blot	9145S (Cell Signaling)
<b>H4Ac</b>	5 µg	ChIP	06-866 (Upstate)
<b>HA</b>	1:2000	Western blot	1 867 432 (Roche)
<b>IKBα</b>	1:500	Western blot	sc-371 (Santa Cruz)
<b>IKBβ</b>	1:500	Western blot	sc-945 (Santa Cruz)
<b>p65</b>	1:1000	Western blot	6556P (Cell Signaling)
<b>Smad2/3</b>	5 µg / 4 µg / 1:200 / 1:500	CoIP/ChIP/Immuno- fluorescencia/ Western blot	sc-8332(Santa Cruz)
<b>Smad4</b>	1:500	Western blot	sc-7966(Santa Cruz)
<b>Smad4</b>	5 µg / 1:500	ChIP/Western blot	sc-7154(Santa Cruz)
<b>Stat3</b>	1:1000	Western blot	C7907 (Cell Signaling)
<b>TRα/β</b>	5 µg/1:1000	ChIP/Western blot	sc-737(Santa Cruz)
<b>TRβ</b>	1:1000	Western blot	sc-772(Santa Cruz)
<b>TRβ</b>	2 µl/reaction	ChIP	Geranado por N. Buisine y L. Sachs
<b>Tubulina</b>	1:10000	Western blot	T5168 (Sigma-Aldrich)
<b>α-SMA</b>	1:2000		A2547 (Sigma-Aldrich)

Tabla 2. Cebadores usados para RT-PCR cuantitativa

Cebador	Secuencia (D: Directo; R: Reverso)
<b>18S</b>	D: 5'-TTCGAACGTCTGCCCTATCA-3' R: 5'-ATGGTAGGCACGGCGACTA-3'
<b>Col1A1</b>	D: 5'-CCTGAGTCAGCAGATTGAGAA-3' R: 5'-ACTGAACTTGACCGTACACCAGTACTCTCCGCTCTTCAA-3'
<b>Col1A2</b>	D: 5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3' R: 5'-CTTGCCCCATTCAATTTGTCT-3'
<b>CRP</b>	D: 5'-CCCTGAACTTTCAGCCGAATACA-3 R: 5'-CGTCCTGCTGCCAGTGATACA-3'
<b>Dio 1</b>	D: 5'-GTTGAACTTTGGCAGTTGCAC-3' R: 5'-GGCTGTGGAGGCAAAGTCATC-3'
<b>EGR1</b>	D: 5'-TTTGCCTCCGTTCCACCTGC-3' R: 5'-TGCCAACTTGATGGTCATGCGC-3'
<b>Fibrinogeno-<math>\beta</math></b>	D: 5'-AGCAGCTGCCACTCAAAGA-3' R: 5'-GAGGAGGTCTGGGAAACAGC-3'
<b>GAPDH</b>	D: 5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3' R: 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
<b>Gp130</b>	D: 5'-TCAACTGGAGCCAGA TTCC-3' R: 5'-CCCACTTGCTTCTTCACTCC-3'
<b>Haptoglobina</b>	D: 5'-TTGCAGTGGACTCAGGCAAT-3' R: 5'-CAGCCGTCATCTGCTTCACAT-3'
<b>Hepcidina</b>	D: 5'-CCCCACCCCTGAACACA-3' R: 5'-ACCGAGTGACAGTCGCTTTT-3'
<b>Id1</b>	D: 5'-TGCAGCTGGAGCTGAACTCT-3' R: 5'-GACACAAGATGCGGTCGTC-3'
<b>IL-6</b>	D: 5'-GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA-3' R: 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3'
<b>IL6-r</b>	D: 5'-TTGTTTGTGAGTGGGGTCT-3' R: 5'-TGGGACTCCTGGGAATACTG-3'
<b>L19</b>	D: 5'-GCGGAAGGGTACAGCCAAT-3' R: 5'-GCAGCCGGCGCAAA-3'
<b>p15</b>	D: 5'-GATCCCAACGCCGTCAAC-3' R: 5'-CCCTCTCGAGCTGCATCAT-3'
<b>SAA1</b>	D: 5'-CTGCAGAAGTGA TCAGCG-3' R: 5'-ATTGTGTACCCTCTCCCC-3'
<b>Smad7</b>	D: 5'-TCCTGCTGTGCAAAGTGTTT-3' R: 5'-GAGGAAGGTACAGCGTCTGG-3'
<b>Socs3</b>	D: 5'-ATCCTGGTGACATGCTCCTC-3' R: 5'-GGCACCAGGTAGACTTTGGA-3'
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	D: 5'-TACAGCAAGGTCCTTGCCCT-3' R: 5'-GCAGCACGGTGACGCC-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	D: 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTA-3' R: 5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	D: 5'-CAGCGGGCATCCACGAA-3' R: 5'-GCCACCGATCCAGACAGA-3'



**Tabla 3. Cebadores usados en los ensayos de ChIP**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
<b>CRP -133 directo</b>	5' - GAAATAATTTTGCTTCCCCTCTTCCC-3'
<b>CRP +18 reverso</b>	5' - TCCTAGATCTCTTGCCTTAGAGCTACCTCC -3'
<b>Hepcidina -244 directo</b>	5' -CCCCACCCCCTGAACACA-3'
<b>Hepcidina -57 reverso</b>	5' - ACCGAGTGACAGTCGCTTTT-3'
<b>Id1 -1300 directo</b>	5' -GTTGACCCTTGGTCAGCAAC-3'
<b>Id1 -1042 reverso</b>	5' -GAGAAAGGAAAGGGAGGGG-3'
<b>P15 -358 directo</b>	5' -AATGTCTCCAGAGCGAAACC-3'
<b>P15 -46 reverso</b>	5' -AAGTCAGCTGTGCCTGAGGT-3'
<b>Smad7 -679 directo</b>	5' -CCCCAGCTCTTCCGATTT-3'
<b>Smad7 -469 reverso</b>	5' -GTCTAGACGGCCACGTGACGA-3'

## RESULTADOS

---



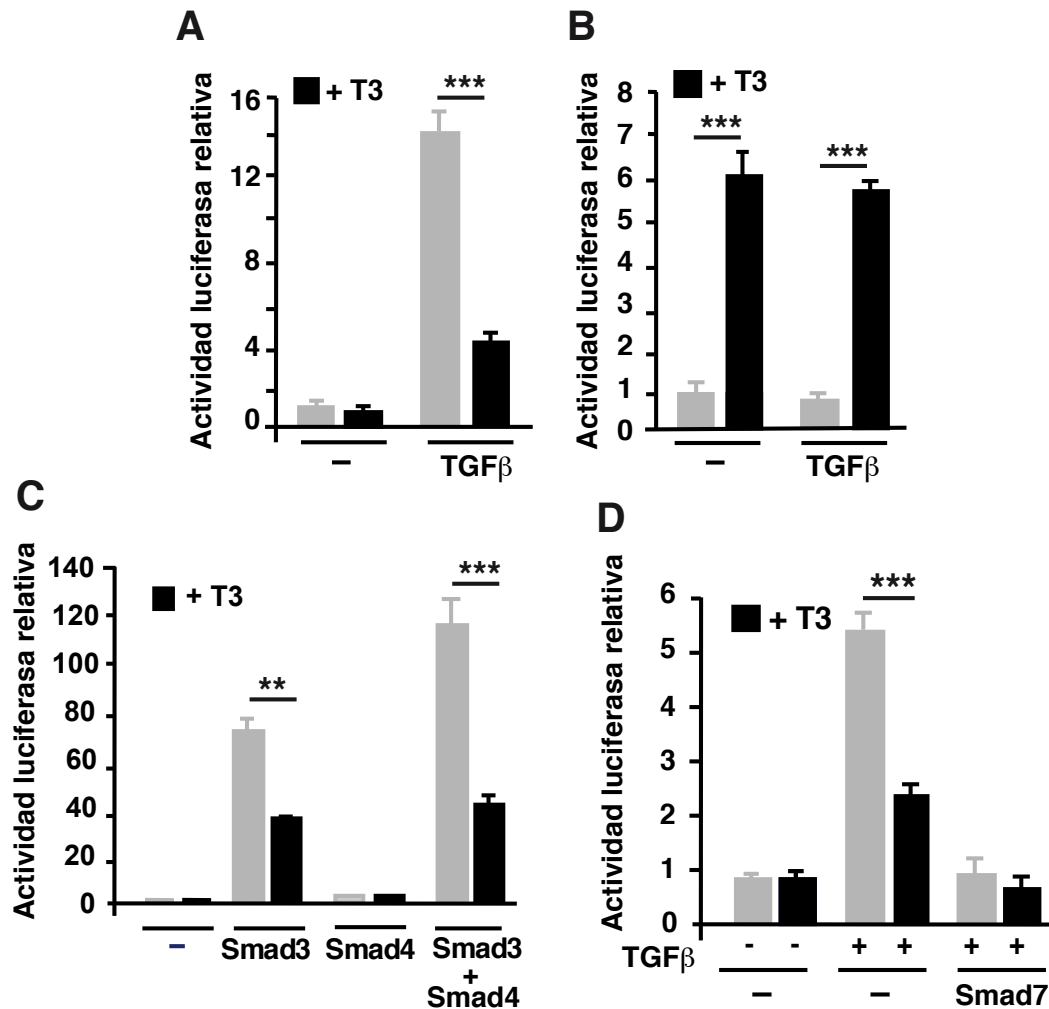
## 1. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la ruta del TGF $\beta$

### 1.1 La T3 antagoniza la transcripción mediada por TGF $\beta$ dependiente de SMAD

Para abordar el estudio de nuestra hipótesis, quisimos, en primer lugar, analizar si las hormonas tiroideas podían regular la transcripción mediada por TGF $\beta$ . Para ello realizamos ensayos de transfección transitoria con plásmidos reporteros de luciferasa en células de hipófisis de rata, GH4C1, ya que estas células responden muy bien a las hormonas tiroideas. Para la transfección se usó el plásmido reportero p3TP-lux, que contiene elementos de unión a SMAD (SBEs) en su promotor (Wrana *et al* 1992). Observamos que el TGF $\beta$  estimula la actividad del reportero en estas células y que la T3, a una concentración fisiológica, disminuye fuertemente esta respuesta (Fig. 7A).

También estudiamos la posibilidad de que pudiese existir ese antagonismo de forma recíproca y para ello repetimos el ensayo, pero en este caso el plásmido reportero contenía elementos de respuesta a hormona tiroidea (TREs) y observamos que el TGF $\beta$  no modificaba la actividad inducida por la T3 (Fig. 7B).

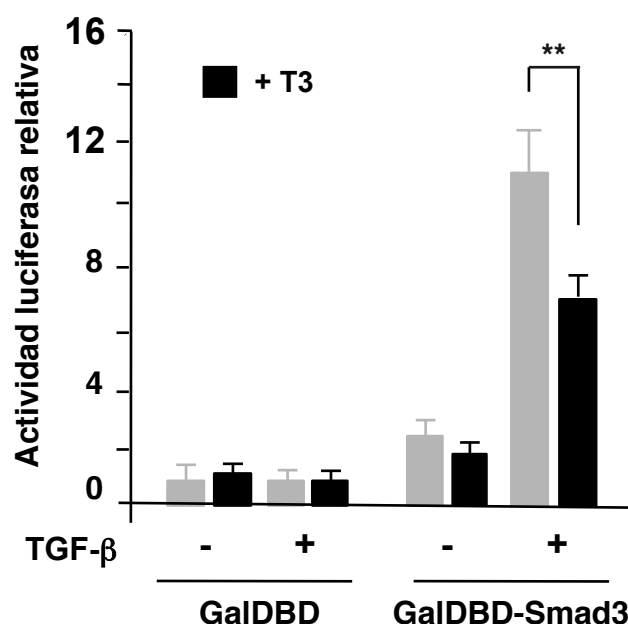
El siguiente paso fue confirmar que el efecto antagónico observado era resultado de una inhibición de la transcripción dependiente directamente de SMAD y no debido a cambios en la expresión o activación de los receptores de TGF $\beta$ . Para ello, las células fueron cotransfectadas con vectores de expresión para SMAD3 y/o SMAD4 y el plásmido reportero p3TP-lux y después incubadas en presencia o ausencia de T3. Observamos que la sobreexpresión de SMAD3 incrementaba significativamente la actividad luciferasa y que ésta aumentaba aún más si se cotransfectaba con SMAD4, la Co-SMAD que, por si sola, carece de actividad transcripcional (Heldin y Moustakas 2012). Pudimos apreciar que la T3, de nuevo, reducía considerablemente la estimulación mediada por estos factores de transcripción, demostrando que la hormona inhibe la transactivación dependiente de TGF $\beta$  mediante la regulación de la actividad de las SMADs (Fig. 7C). Estos resultados fueron fehacientemente apoyados por el hecho de que tanto la estimulación dependiente de TGF $\beta$  como el antagonismo de la T3, fueron suprimidos tras la expresión de la SMAD inhibitoria, SMAD7 (Fig. 7D).



**Figura 7. La hormona tiroidea T3 inhibe la transcripción dependiente de TGFβ.** (A) Ensayos de transfección transitoria en células GH4C1 con el plásmido reportero p3TP-lux el cual consta de un fragmento del promotor de PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*), que contiene sitios SBE, seguido del gen de la luciferasa. La actividad luciferasa se determinó en células incubadas durante 36 horas con T3 5 nM en presencia y ausencia de TGFβ 10 ng/ml durante las últimas 5 horas. (B) Ensayos paralelos llevados a cabo con el plásmido reportero que contiene sitios consenso TRE en su promotor. (C) Co-transfección del plásmido reportero p3TP-lux y vectores de expresión de SMAD3 (150 ng), SMAD4 (200 ng), ambos o la misma cantidad del vector vacío (-). La actividad luciferasa fue determinada 36 horas después de la incubación de las células transfectadas en presencia o ausencia de T3. (D) Co-transfección del plásmido reportero p3TP-lux y un vector de expresión de SMAD7 (100 ng) o el vector vacío. Las células se trataron con T3 (5 nM, 36 horas) y/o TGFβ (10 ng/ml, las últimas 5 horas) según se indica. Los datos muestran la media ± S.D. (n=3). Se muestran las diferencias significativas entre las células tratadas y no con T3 tras un análisis estadístico mediante un test ANOVA.

Para validar que la T3 inhibe la actividad transcripcional de las SMADs realizamos de nuevo ensayos de luciferasa pero en este caso nos valimos del sistema GAL4-UAS. Se cotransfectó el plásmido de fusión GAL-SMAD3, que consiste en el dominio de unión a DNA de GAL4 seguido de SMAD3 y un reportero de luciferasa que contiene motivos de unión para GAL4. De forma

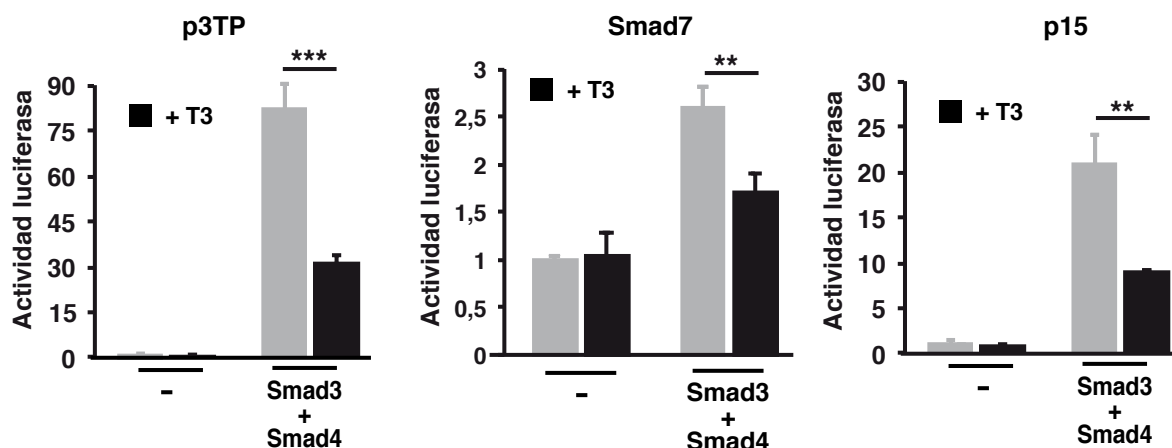
paralela a los cambios observados en la transactivación del plásmido p3TP-lux, el tratamiento con TGF $\beta$  incrementó fuertemente la activación dependiente de SMAD3, y, de nuevo, esta respuesta se vio reducida en las células tratadas con T3. Sin embargo, como era de esperar, ni el TGF $\beta$  ni la T3 afectaron la actividad de un plásmido que solo contenía el dominio de unión a DNA de GAL4 (GAL-DBD) (Fig 8). A la vista de estos resultados se confirma que la T3 parece reprimir directamente la transcripción dependiente de SMAD.



**Figura 8. La T3 inhibe la actividad transcripcional de SMAD3.** Las células GH4C1 fueron transfectadas con 200 ng del plásmido reportero UAS y 100 ng de la construcción GAL4DBD-SMAD3 o el GAL4DBD solo. La actividad luciferasa se determinó después de la incubación con T3 5 nM durante 36 horas y/o con TGF $\beta$  10 ng/ml durante las últimas 5 horas. Los datos muestran la media  $\pm$  S.D. (n=3). Se muestran las diferencias significativas entre las células tratadas y no con T3 tras un análisis estadístico mediante un test ANOVA.

El efecto antagónico de la T3 también fue observado en las células GH4C1 transfectadas con otros plásmidos reporteros que contienen SBEs. De este modo, ratificamos que las SMADS estimulaban la actividad de los promotores de p15 y Smad7 y que la T3 también antagonizaba esta activación (Fig. 9).

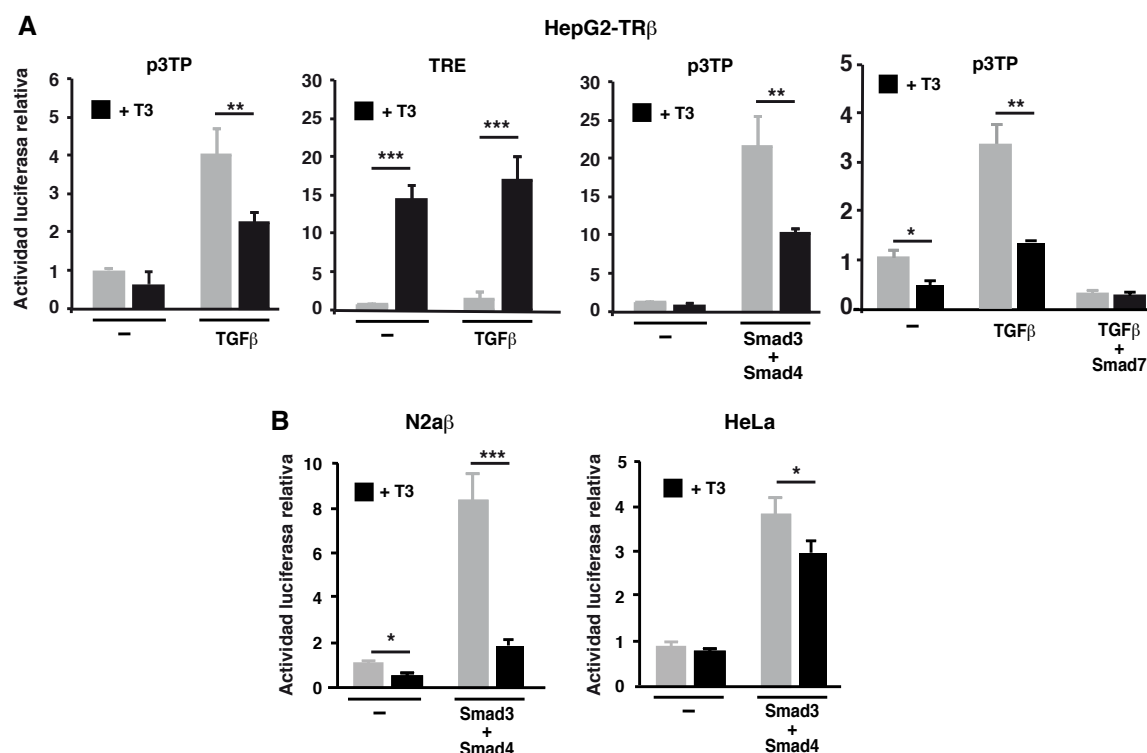
## RESULTADOS



**Figura 9. La T3 inhibe la activación dependiente de SMAD de distintos promotores.** Las células GH4C1 fueron transfectadas con el plásmido p3TP-lux y con los plásmidos reporteros de los promotores de Smad7 o p15, que también contienen elementos SBEs. Dichos plásmidos fueron cotransfectados con 150 ng de un vector de expresión de SMAD3 y 200 ng de un vector de expresión de SMAD4 o el correspondiente vector vacío. La actividad luciferasa se determinó tras 36 horas de tratamiento en ausencia y presencia de T3 (5 nM). Los datos muestran la media  $\pm$  S.D. (n=3). Se indican las diferencias significativas entre las células tratadas y no con T3 tras un análisis estadístico mediante un test ANOVA.

Para analizar si el efecto inhibitorio de la T3 se observaba también en otros tipos celulares, transfectamos el plásmido reportero p3TP-lux en células humanas de hepatocarcinoma HepG2-TR $\beta$  que expresan de forma estable el receptor de hormonas tiroideas TR $\beta$ 1 (Chan y Privalsky 2009). Observamos de nuevo que la incubación con TGF $\beta$  o la transfección de SMAD3 y SMAD4 activaba el promotor y que la T3 atenuaba dicha activación, la cual fue de nuevo abolida al cotransfectar con SMAD7. Por otra parte, también de forma paralela a lo observado en las células GH4C1, la transactivación dependiente de T3 no se vio afectada por el tratamiento con TGF $\beta$  (Fig. 10A).

También estudiamos otros tipos celulares como las células de neuroblastoma murino N2a $\beta$ , que expresan de forma estable el TR $\beta$ 1, y las células HeLa humanas, obteniendo nuevamente una reducción de la transactivación dependiente de SMAD por la T3, siendo esta disminución menor en las HeLa ya que en este tipo celular los niveles de los TRs endógenos son bajos (Fig. 10B).



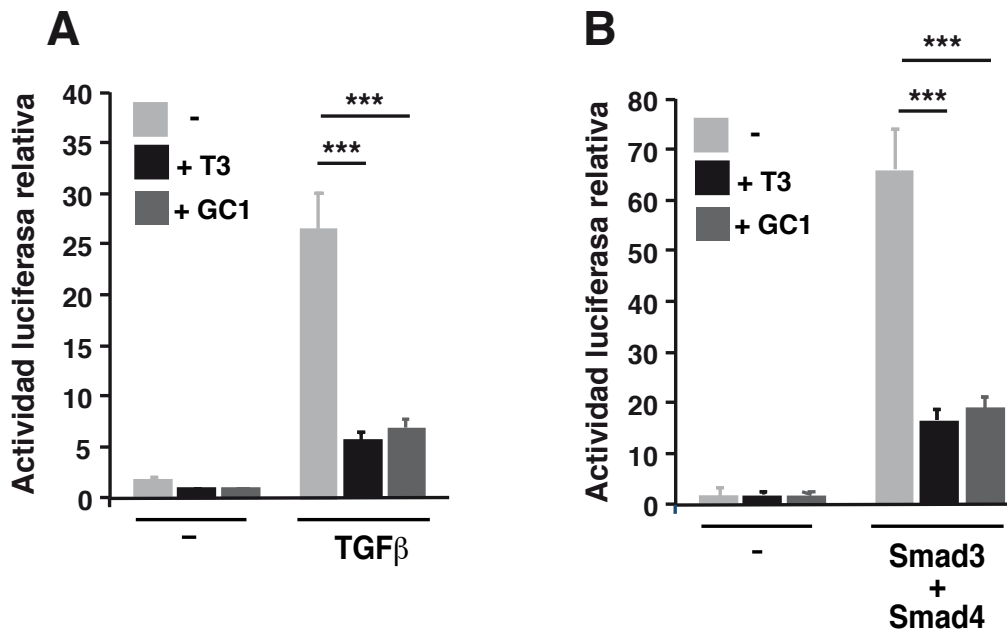
**Figura 10. La T3 inhibe la transcripción dependiente de SMAD con independencia del tipo celular.** (A) Las células HepG2-TR $\beta$  fueron transfectadas con el p3TP-lux (gráfica de la izquierda) o con un plásmido reportero que contiene un TRE (segunda gráfica) y se incubaron con T3 (5 nM) durante 36 horas y/o con TGF $\beta$  (10 ng/ml) durante las últimas 5 horas. En la tercera gráfica se muestra la actividad luciferasa de las células cotransfectadas con p3TP-lux y los vectores de expresión de SMAD3 (150 ng) y SMAD4 (200 ng) e incubadas en presencia o ausencia de T3. En la gráfica de la derecha, las células fueran transfectadas con un vector vacío o con un vector de expresión de SMAD7 (100 ng) y tratadas con T3 y/o con TGF $\beta$  como se indica. (B) Las células N2a $\beta$  y las células HeLa se cotransfectaron con el plásmido reportero p3TP-lux y los vectores de expresión de SMAD3 y SMAD4. Se midió la actividad luciferasa en las células tratadas y no tratadas con T3. Los datos muestran la media  $\pm$  S.D. (n=3). Se indican las diferencias estadísticamente significativas (ANOVA post-test) entre las células tratadas y no tratadas con T3.

## 1.2. Tanto el TR $\beta$ como el TR $\alpha$ pueden mediar el efecto antagónico de la T3 sobre la ruta del TGF $\beta$

Una vez corroborado el efecto de la T3 sobre la señalización por TGF $\beta$ , quisimos ver el papel que jugaban las diferentes isoformas del TR en este efecto.

## RESULTADOS

En primer lugar utilizamos el análogo de la T3, GC-1, que es específico del TR $\beta$ , y observamos que éste era tan potente como la T3 para reprimir la respuesta a TGF $\beta$  o a SMADs en las células GH4C1 (Fig. 11A y B). Esto demuestra que el TR $\beta$  es el principal mediador del antagonismo transcripcional en estas células, lo que no es sorprendente porque las células hipofisarias expresan mayoritariamente TR $\beta$ .



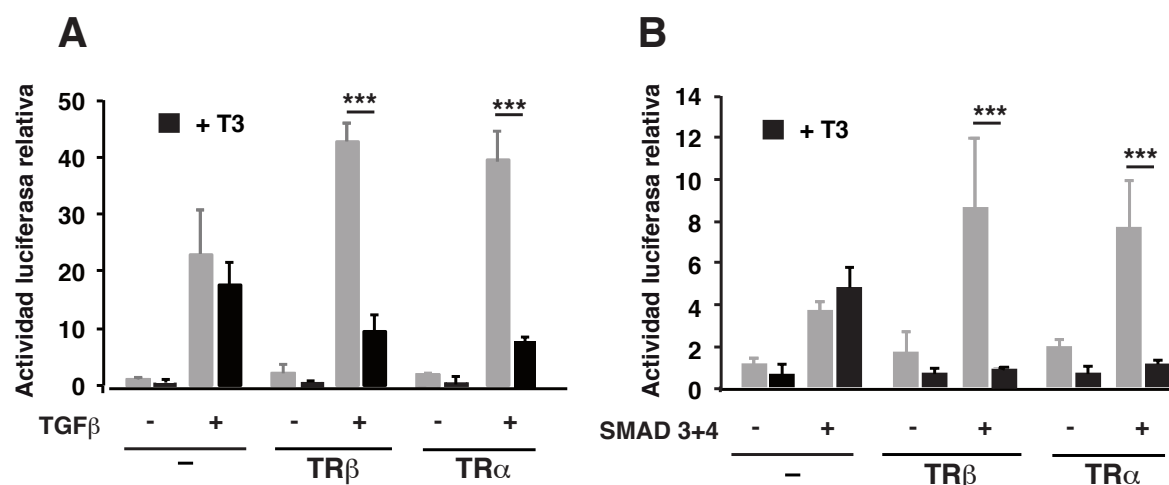
**Figura 11. Un ligando específico de TR $\beta$  puede antagonizar la actividad transcripcional de TGF $\beta$ /SMAD.**

(A) Las células GH4C1 fueron transfectadas con el plásmido reportero p3TP-lux y tratadas durante 36 horas con T3 5 nM o con la misma concentración del ligando específico de TR $\beta$ , GC-1. El TGF $\beta$  (10 ng/ml) se añadió durante las últimas 5 horas y la actividad luciferasa fue determinada. (B) Las células fueron cotransfectadas con el plásmido reportero y vectores de expresión para SMAD3 (150 ng) y SMAD4 (200 ng) o con el correspondiente vector vacío y la actividad luciferasa fue medida tras el tratamiento con o sin T3 o GC-1. Los datos representan las medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se muestran las diferencias significativas tras un análisis estadístico mediante ANOVA entre las células tratadas y no tratadas con T3 o GC-1.

Una vez comprobado que el efecto de la T3 sobre la señalización del TGF $\beta$  podía ser mediado por el TR $\beta$  quisimos analizar si también la unión de la T3 al TR $\alpha$  ejercía la misma inhibición. Para abordar este punto usamos las células epiteliales de visión Mv1Lu, ya que es una línea celular ampliamente utilizada para estudiar la señalización del TGF $\beta$ . En estas células la T3 no es capaz de reprimir la estimulación de un promotor que contiene SBEs, por TGF $\beta$  o SMADs, lo que sugiere que estas células no expresan TRs o los expresan a muy bajos niveles. Sin embargo, cuando se transfectaban con un vector de expresión de TR $\beta$  o TR $\alpha$  observamos, por una parte,



una activación del promotor independiente de ligando y, por otra, una fuerte represión por la T3 tanto de la actividad basal como de la mediada por TGF $\beta$  o SMADs (Fig. 12A y B). Por lo tanto se puede concluir que ambas isoformas del receptor de hormonas tiroideas pueden mediar la represión de la actividad del TGF $\beta$ /SMADs por T3, así como inducir una cierta actividad en ausencia de ligando.



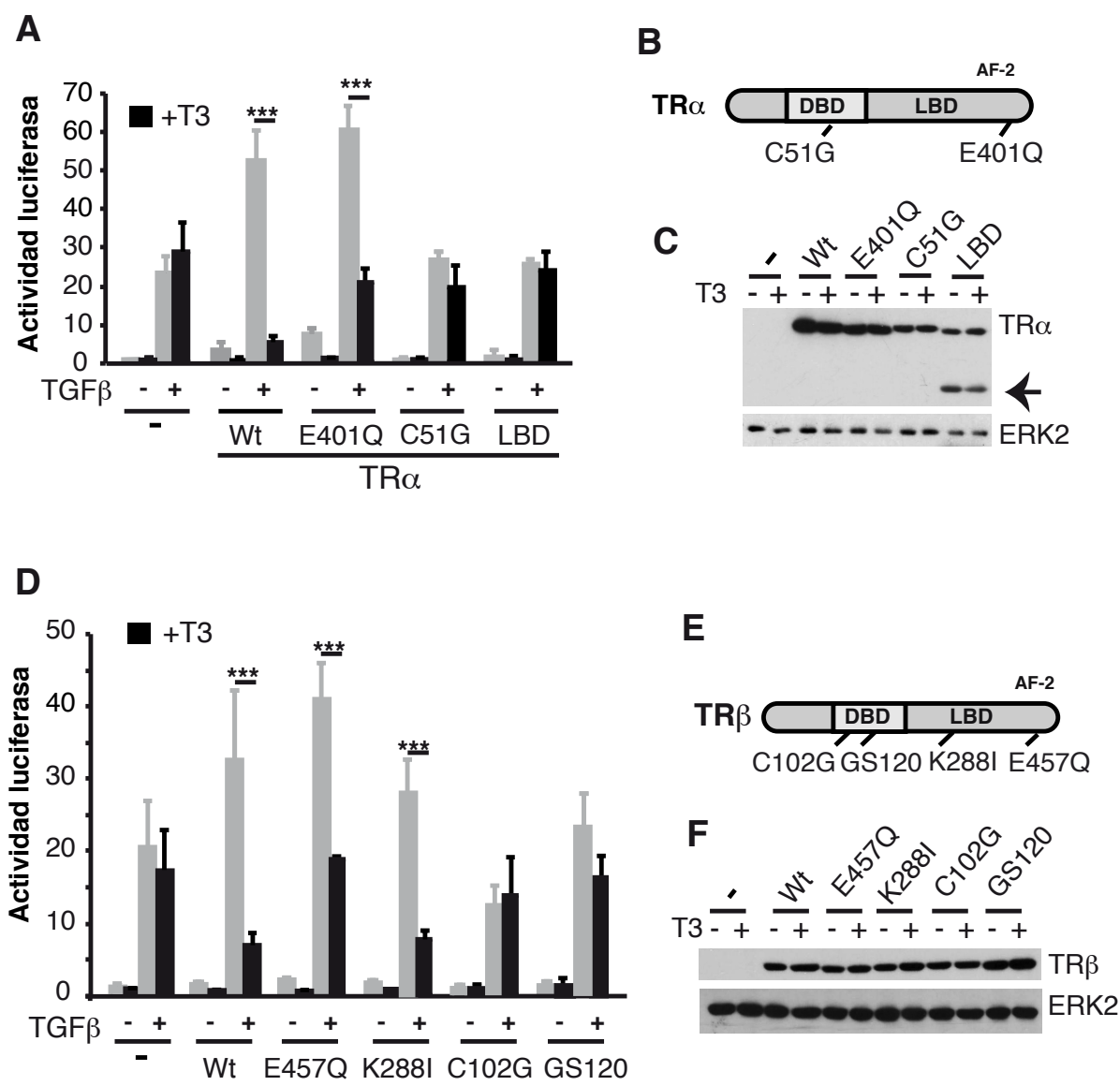
**Figura 12. Tanto el TR $\alpha$  como TR $\beta$  pueden antagonizar la actividad transcripcional de TGF $\beta$ /SMAD.** (A) Las células Mv1Lu fueron cotransfectadas con el plásmido p3TP-lux, que contiene elementos SBE, y con vectores de expresión de TR $\beta$  o TR $\alpha$  (25 ng) o con la misma cantidad del vector vacío (-). La actividad luciferasa fue determinada tras el tratamiento con T3 durante 36 horas y/o con TGF $\beta$  durante las últimas 5 horas. (B) Las células Mv1Lu fueron cotransfectadas con el plásmido reportero p3TP-lux, los vectores de expresión de TR $\beta$  o TR $\alpha$  y los de SMAD3 (150 ng) y de SMAD4 (200 ng) o el vector vacío. La actividad reportera fue medida tras el tratamiento con y sin T3 durante 36 horas. Los datos muestran la media  $\pm$  S.D. (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas, tras el análisis estadístico mediante ANOVA, entre las células tratadas y no tratadas con T3.

### 1.3. Dominios de los TRs implicados en la represión de la transcripción dependiente de TGF $\beta$ por la T3

Tras comprobar que ambas isoformas del receptor eran capaces de mediar el efecto represor, quisimos analizar qué regiones de éste estaban implicadas en la inhibición observada. Para ello, utilizamos nuevamente las células Mv1Lu que se cotransfectaron con un plásmido reportero que contenía un elemento SBE y vectores de expresión para el receptor nativo o para mutantes de diferentes dominios de TR $\beta$  y TR $\alpha$  (Fig. 13B y E). No detectamos expresión endógena del receptor en estas células, como suponíamos, ya que no habíamos visto respuesta a T3. Tanto los receptores nativos como los mutantes fueron expresados en niveles comparables tanto en

## RESULTADOS

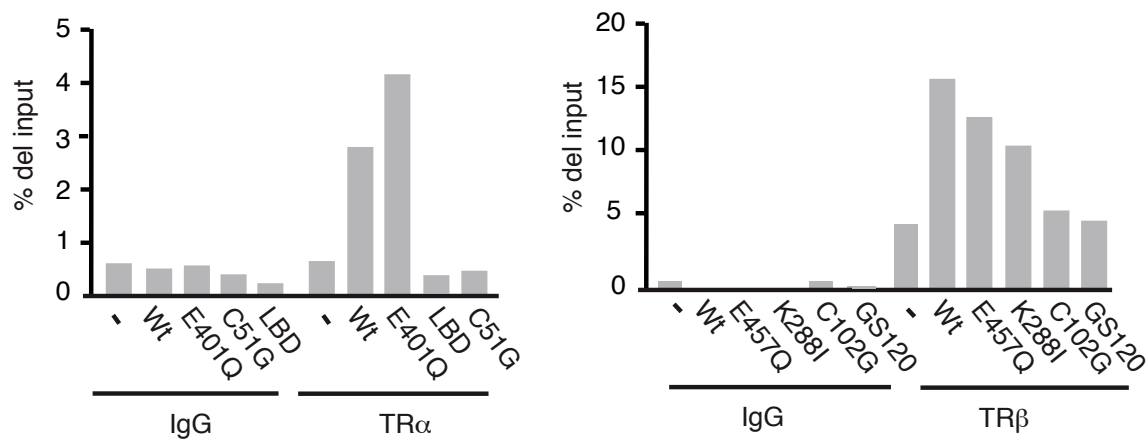
presencia como en ausencia de T3 (Fig. 13C y F). Las mutaciones K288I y E457Q en el TR $\beta$  y la mutación equivalente de esta última en el TR $\alpha$ , E401Q, se localizan en el dominio de unión a ligando (LBD) e impiden el reclutamiento de coactivadores y la transcripción dependiente de T3, aunque si son capaces de unir T3 (García-Silva *et al* 2011). Observamos que estos mutantes mantenían la actividad independiente de ligando y que la T3 reprimía de forma significativa la transactivación por el TGF $\beta$ , aunque de forma menos potente que en las células que expresaban los receptores nativos (Fig. 13A y D). Por el contrario, el dominio LBD aislado del receptor TR $\alpha$  no era capaz de antagonizar la estimulación producida por el TGF $\beta$  (Fig. 13A). La implicación del dominio de unión a ADN (DBD) en el antagonismo fue demostrado usando mutantes en dicho dominio (Fig. 13B y E). Las mutaciones C51G en el TR $\alpha$  o C102G en el TR $\beta$  afectan a un residuo conservado en el primer dedo de zinc que participa en la coordinación del ión de zinc (Rastinejad *et al* 1995), y en el mutante GS120 de TR $\beta$  (Shibusawa *et al* 2003), se ven afectados dos residuos en la secuencia de la caja P responsable del reconocimiento de los elementos TRE, siendo estos residuos cambiados por los presentes en varios receptores de esteroides, alterando así la especificidad de unión al ADN. En ausencia de T3, la expresión de los mutantes del DBD no incrementó la actividad reportera en respuesta a TGF $\beta$  y, en presencia de T3, no fue capaz de mediar una inhibición significativa de la transactivación inducida por este factor. Estos datos sugieren que el dominio de unión a ADN se requiere para el antagonismo de la T3 sobre la transcripción mediada por TGF $\beta$  (Fig. 13A y D).



**Figura 13. Dominios del TR $\beta$  y del TR $\alpha$  implicados en la represión por T3 de la transcripción inducida por TGF $\beta$ .** (A) Ensayos de luciferasa en las células Mv1Lu transfectadas con un vector vacío o con vectores de expresión para el TR $\alpha$  nativo y mutantes del mismo. La actividad luciferasa fue medida en células incubadas con T3 durante 36 horas y con TGF $\beta$  en las últimas 5 horas. Los resultados se expresan en relación a las células sin tratar y transfectadas con el vector vacío. (B) Esquema del TR $\alpha$  mostrando la posición de las mutaciones utilizadas. DBD: dominio de unión a DNA; LBD: dominio de unión al ligando; AF-2: dominio de actividad transcripcional dependiente de ligando. (C) Western blot de TR $\alpha$  en células transfectadas con los diferentes mutantes tratadas y sin tratar con T3. La flecha indica la movilidad del LBD del TR $\alpha$ . ERK2 se usó como control de carga. (D) Actividad luciferasa en células transfectadas con el TR $\beta$  y los mutantes de éste tratadas como en el apartado A. (E) Esquema de los mutantes del TR $\beta$  usados. (F) Expresión de los mutantes de TR $\beta$  en las células transfectadas usadas para los ensayos de luciferasa. Todos los datos muestran las medias  $\pm$  S.D. (n=3). Se indica la significancia estadística tras un test ANOVA (Bonferroni) entre las células tratadas y no tratadas con T3.

## RESULTADOS

Ya que en los mecanismos de transrepresión transcripcional puede estar implicado el reclutamiento de los receptores nucleares a sitios de unión al DNA de otros factores, quisimos estudiar si había una unión de los receptores a las regiones SBEs de genes dianas del TGF $\beta$  y si ésta estaba afectada cuando se utilizaban los diferentes mutantes. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en las células GH4C1. Ya que estas células expresan predominantemente TR $\beta$ , observamos que el TR $\beta$ , pero no el TR $\alpha$ , estaba unido a la región que contiene los SBEs, y que esta unión se veía incrementada tras la sobreexpresión del receptor nativo o de los mutantes del LBD. Por el contrario, este aumento en la unión no se apreció en células transfectadas con los mutantes del DBD, sugiriendo que los residuos mutados en este dominio son importantes para la asociación de los receptores con los SBEs (Fig. 14).

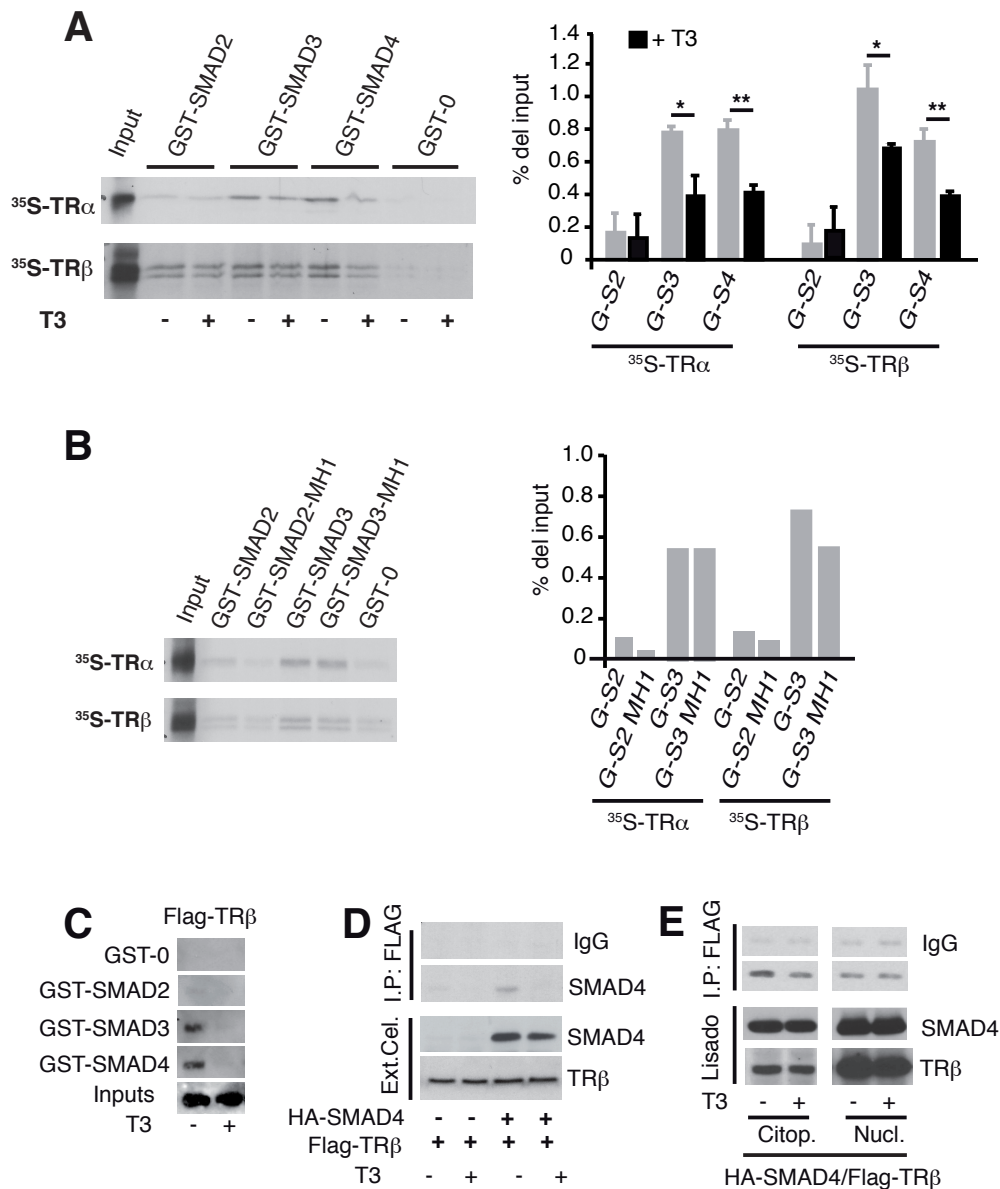


**Figura 14. Unión del TR $\beta$ , TR $\alpha$  y sus mutantes a las regiones SBE.** Ensayos ChIP llevados a cabo con una IgG control y anticuerpos para TR $\beta$  y TR $\alpha$  en las células GH4C1 transfectadas con un vector vacío (-) o con los vectores de expresión para los receptores indicados. La precipitación del ADN fue examinada mediante RT-PCR cuantitativa con cebadores específicos de la región del promotor de Id1 -1300/-1042 que contiene sitios SBE.

### 1.4. Los receptores de hormonas tiroideas interaccionan con las SMADs

Para explorar el mecanismo subyacente a la inhibición de la señalización de las SMADs por T3, analizamos la posibilidad de que existiese una interacción directa entre el TR y las SMADs. Para ello realizamos ensayos de GST “pull-down” con SMAD2, SMAD3 y SMAD4 unidas a GST y con el TR $\beta$  y el TR $\alpha$  traducidos “in vitro” y marcados con  $^{35}\text{S}$ . En estos ensayos observamos que

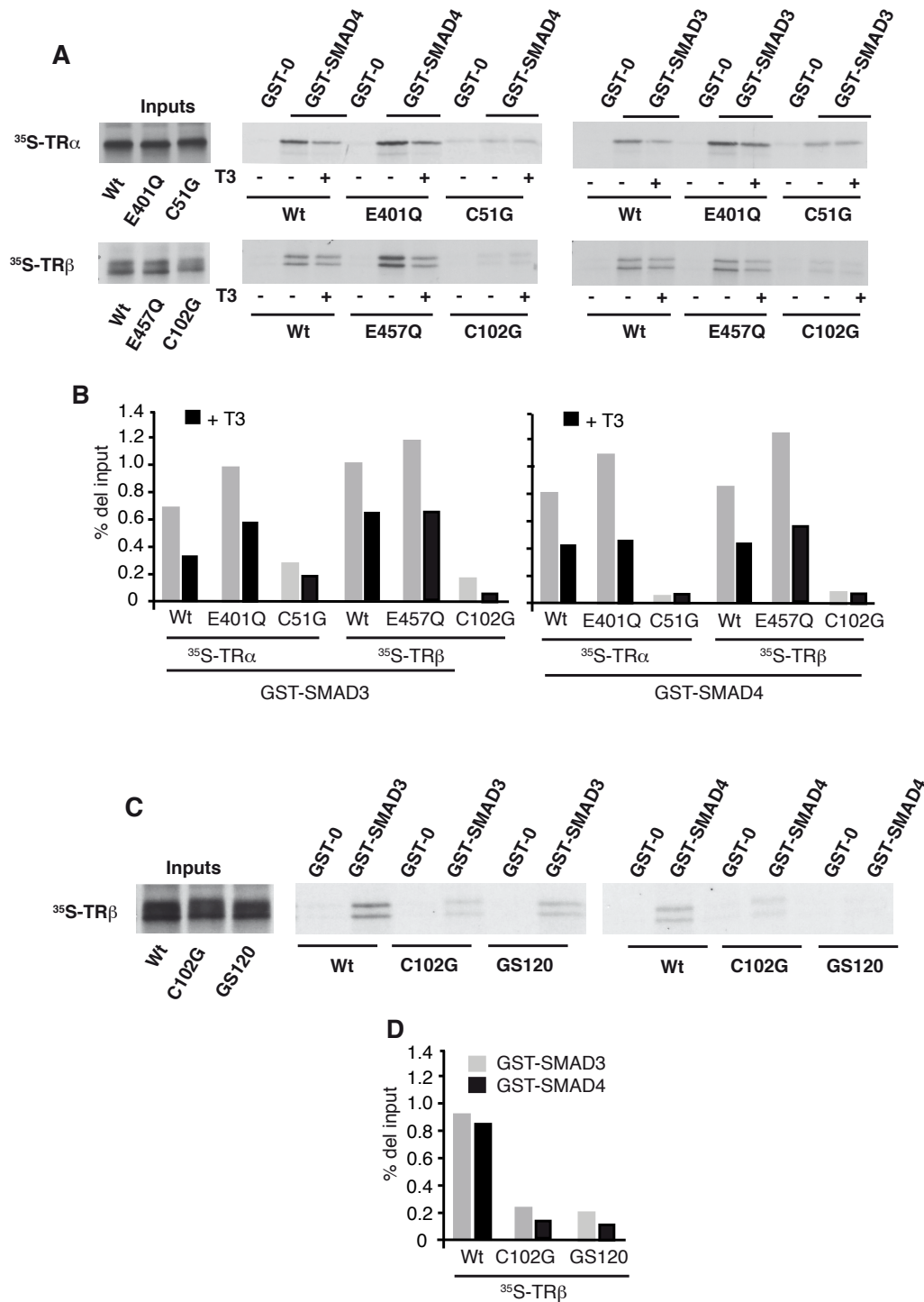
SMAD2 prácticamente no interaccionaba con los TRs, mientras que existía una interacción detectable y similar entre SMAD3 y SMAD4 y ambos receptores. Esta interacción disminuía significativamente en presencia de T3 (Fig. 15A). Mas concretamente, vimos que el dominio Mad de Homología (MH1) de la SMAD3 era suficiente para asociarse con los receptores (Fig. 15B). Confirmamos la interacción entre el TR y SMAD3 y SMAD4 en extractos de células Cos-1 transfectadas con TR $\beta$ -Flag e incubadas en presencia o ausencia de T3. Estos experimentos mostraron de nuevo una asociación entre el TR y las SMADs que era revertida en presencia de T3 (Fig. 15C). Una interacción entre ambos factores de transcripción que se inhibía en presencia de T3 se observó también en ensayos de coinmunoprecipitación realizados en células HeLa transfectadas con SMAD4-HA y TR $\beta$ -Flag (Fig. 15D). Además quisimos ver si esta interacción tenía lugar en el citoplasma o en el núcleo y observamos que, a pesar de que tanto el receptor como la SMAD4 transfectados eran más abundantes en el núcleo, sorprendentemente, la interacción tenía lugar fundamentalmente en el citoplasma (Fig. 15E).



**Figura 15. Interacción entre los TRs y las SMADS.** (A) El panel izquierdo muestra ensayos de “pull-down” con GST-SMAD2 (G-S2), GST-SMAD3 (G-S3) o GST-SMAD4 (G-S4) y TR $\beta$  o TR $\alpha$  traducidos in vitro y marcados con  $^{35}\text{S}$ . Los ensayos fueron realizados en ausencia y presencia de T3. El primer carril del gel muestra el 20% del receptor utilizado (“input”). El panel derecho muestra la cuantificación de los datos, expresados como porcentaje de los “inputs” tras la substracción de los valores obtenidos con el GST-0, utilizado como control negativo. Son medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. Se indican las diferencias significativas entre la ausencia y la presencia de T3. (B) Ensayos de pull-down de TR $\beta$  o TR $\alpha$  con GST-SMAD2, GST-SMAD2-MH1 (fragmento N-terminal MH1 de Smad2), GST-SMAD3, GST-SMAD3-MH1 (fragmento N-terminal MH1 de Smad3) o GST-0. Los datos fueron cuantificados de dos experimentos independientes. (C) GST-0, GST-SMAD2, GST-SMAD3 o GST-SMAD4 fueron incubados con 700  $\mu\text{g}$  de extractos totales de células Cos-1 transfectadas con el TR $\beta$  etiquetado con Flag y tratadas con o sin T3 a una concentración de 50 nM durante 1 hora. El receptor unido fue analizado mediante Western blot. Los inputs representan el 10% de

las proteínas usadas para el ensayo. (D) Las células HeLa fueron transfectadas con SMAD4-HA y con el TR $\beta$  etiquetado con Flag y, 36 horas después, se trataron con 50 nM de T3 durante 1h. Se realizó la inmunoprecipitación sobre 700  $\mu$ g de proteínas con 3  $\mu$ g de anticuerpo anti-Flag y con su correspondiente IgG control. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante Western blot junto con el 10% del extracto celular (input) con anticuerpos para SMAD4 o TR $\beta$ . (E) Las células fueron transfectadas con SMAD4-HA y con Flag-TR $\beta$  y tratadas con o sin T3 como en el apartado D, pero en este caso se hizo una extracción diferencial de núcleo y citoplasma y sobre estos extractos se realizó la inmunoprecipitación.

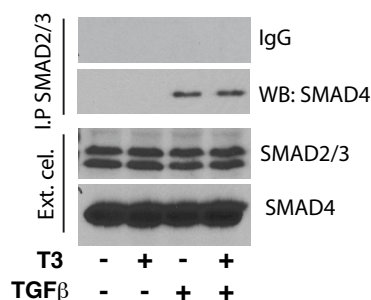
A continuación, analizamos si las diferentes mutaciones de los receptores que habíamos utilizado en los ensayos de transfección transitoria afectaban a la unión de los TRs con las SMADS. Para ello, realizamos nuevamente ensayos de pull-down, observando que los mutantes del dominio LBD, TR $\alpha$  E401Q y TR $\beta$  E457Q, que eran capaces de mediar el antagonismo de la T3 sobre la actividad transcripcional del TGF $\beta$ , mostraban una fuerte asociación con la SMAD3 y la SMAD4. Sin embargo, los mutantes del DBD, TR $\alpha$  C51G y TR $\beta$  C102G y TR $\beta$  GS120, que no mediaban una inhibición de la actividad transcripcional del TGF $\beta$ , también muestran una interacción con los SMADs fuertemente reducida (Fig. 16A, B y C).



**Figura 16. Interacción entre los diferentes mutantes del TRα y del TRβ y las SMADS.** (A) Ensayos de pull-down entre GST-0, GST-SMAD3 y GST-SMAD4 y los mutantes de TRα y TRβ de los dominios LBD y DBD indicados. Los ensayos fueron llevados a cabo en presencia y ausencia de T3 de igual forma que en la figura 15A. (B) Cuantificaciones de los geles mostrados en el apartado A. (C) Comparación, mediante ensayos de GST pull-down, de la interacción del TRβ nativo y de los mutantes del dominio DBD indicados con SMAD3 y SMAD4. Se muestran tanto los geles como su cuantificación. Las cuantificaciones del apartado B y C representan la media obtenida de dos experimentos independientes.



Por otra parte, podía existir la posibilidad de que la interacción de los TRs con las SMADS pudiese deshacer la formación del complejo que se forma entre las SMAD2/3 y la SMAD4 al activarse la ruta del TGF $\beta$ . Para analizar esta posibilidad realizamos ensayos de coimmunoprecipitación entre el SMAD3 y el SMAD4 tratando las células con TGF $\beta$  y en presencia o en ausencia de T3. Sin embargo, observamos que esta interacción no se veía afectada en las células tratadas con T3 (Fig. 17).

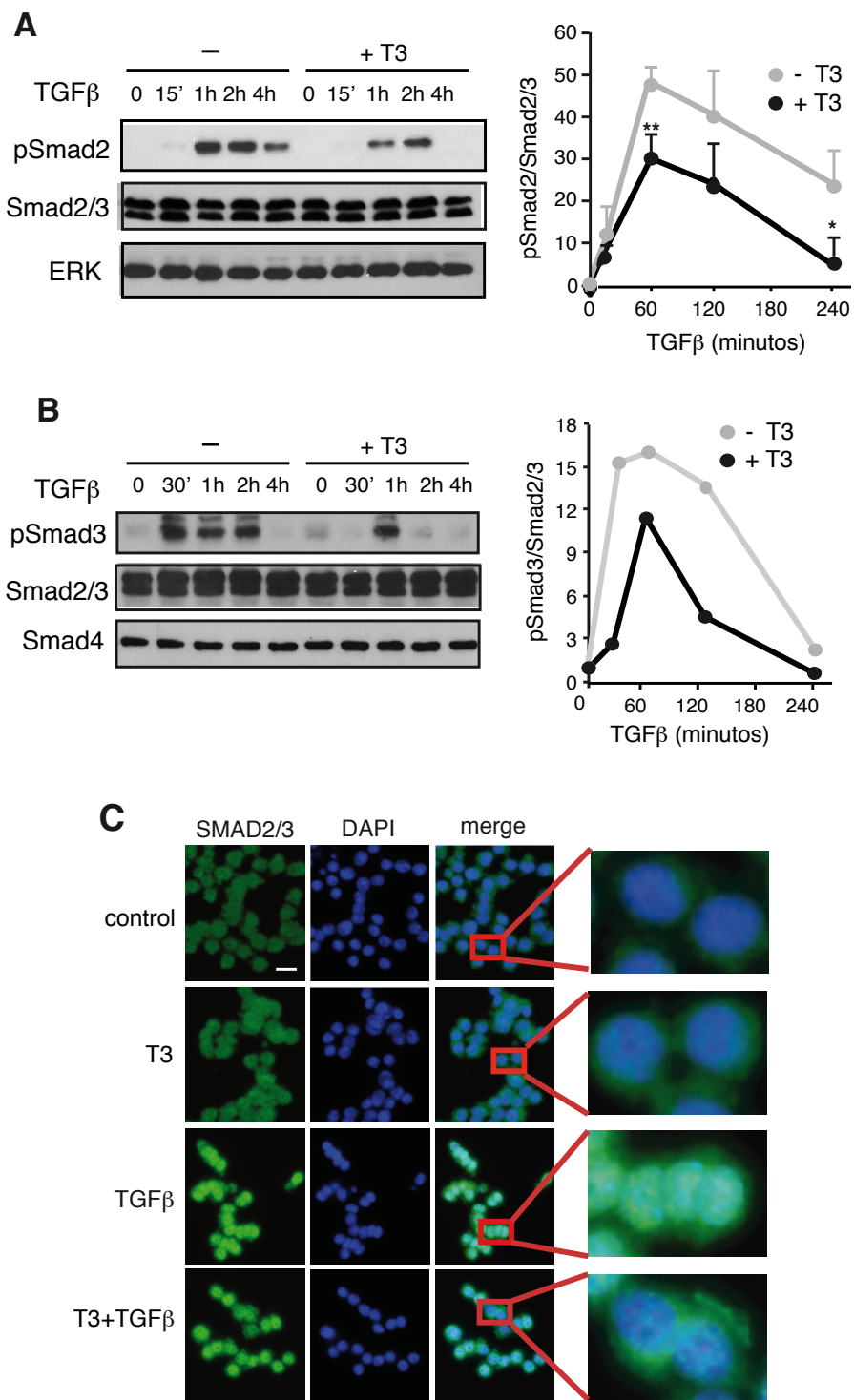


**Figura 17. La T3 no deshace la interacción entre SMAD2/3 y la SMAD coreguladora.** Las células GH4C1 fueron tratadas con T3 5 nM y/o con TGF $\beta$  a una concentración de 10 ng/ml durante 1 hora. Los extractos celulares (1,7 mg) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo para SMAD2/3 o con su correspondiente IgG control y la SMAD4 fue posteriormente analizada mediante Western blot. Se muestran también los niveles de SMAD2/3 y SMAD4 en 70  $\mu$ g del extracto celular total.

### 1.5. Efecto de la T3 sobre la fosforilación de las SMADs en respuesta a TGF $\beta$

Ya que la activación de los factores de transcripción SMAD2 y SMAD3 es consecuencia de su fosforilación en respuesta al TGF $\beta$ , lo siguiente que nos propusimos analizar fue si la T3 tenía algún efecto sobre dicha fosforilación. Tal y como era de esperar (Feng y Derynck 2005), el TGF $\beta$  indujo una rápida fosforilación de SMAD2 y de SMAD3 en las células GH4C1 y observamos que el tratamiento con T3 reducía significativamente dicha fosforilación, sin alterar los niveles totales de SMAD2/3 y de SMAD4 (Fig. 18A y B). La cuantificación de la relación pSMAD/SMAD total (panel derecho de las figuras 18A y B) confirma la inducción de la fosforilación de SMAD2 y 3 por el TGF $\beta$  y la atenuación de ésta por la hormona. La fosforilación de las proteínas R-SMAD y su asociación con la Co-SMAD promueve la translocación de los complejos SMAD al núcleo (Feng y Derynck 2005). Mediante una tinción de inmunofluorescencia se pudo observar que la inhibición de la activación de las SMADs por la T3 estaba asociada a una inhibición parcial de la translocación al núcleo de las SMAD2/3 en respuesta a TGF $\beta$  (Fig 18C).

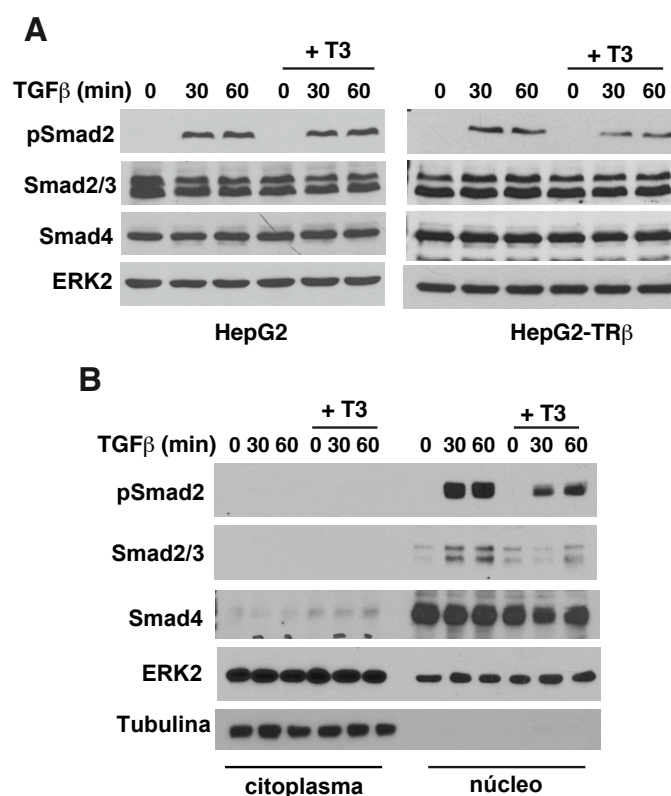
## RESULTADOS



**Figura 18. Efecto de la T3 sobre la fosforilación y translocación al núcleo de las SMADs.** (A) Análisis mediante Western blot de extractos de células GH4C1 tras el tratamiento con T3 (5 nM) durante 36 horas y con TGFβ (10 ng/ml) durante los periodos indicados, con anticuerpos para fosfo-SMAD2 (pSMAD2) y SMD2/3. ERK se usó como control de carga. En el panel derecho se muestra la media  $\pm$  S.D. de las cuantificaciones de la relación pSMAD2/SMAD2,3 de tres experimentos independientes. Los datos están expresados como veces de inducción respecto a los valores obtenidos a tiempo 0 en las células sin tratar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas tras un análisis mediante T-Student entre las células

tratadas y no tratadas con T3. (B) Mismo experimento que en el apartado A pero en este caso se usaron anticuerpos para pSMAD3, SMAD2/3 y también para SMAD4 total. En este caso las cuantificaciones (panel derecho) corresponden a la media de dos experimentos. (C) Las células fueron incubadas con T3 durante 36 horas y/o con TGF $\beta$  durante 1 hora, posteriormente fijadas y analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo para SMAD2/3. Se muestran imágenes representativas de SMAD2/3, la tinción nuclear de DAPI y la superposición de ambas. La barra de escala es de 50  $\mu$ m. A la derecha se puede observar el detalle de las zonas indicadas.

Quisimos comprobar si esta inhibición de la fosforilación y translocación de SMADs al núcleo ocurría en otro tipo celular. Para ellos usamos las células de hepatocarcinoma HepG2 y las HepG2-TR $\beta$ , previamente descritas, que sobreexpresan el TR $\beta$ 1. Observamos que la T3 reducía la fosforilación de SMAD2 en las células HepG2-TR $\beta$  pero no en las HepG2 parentales (Fig. 19A). También vimos que la T3 causaba una disminución de los niveles de SMAD2/3 y SMAD4 en el núcleo de las células HepG2-TR $\beta$  tratadas con TGF $\beta$  (Fig. 19B).

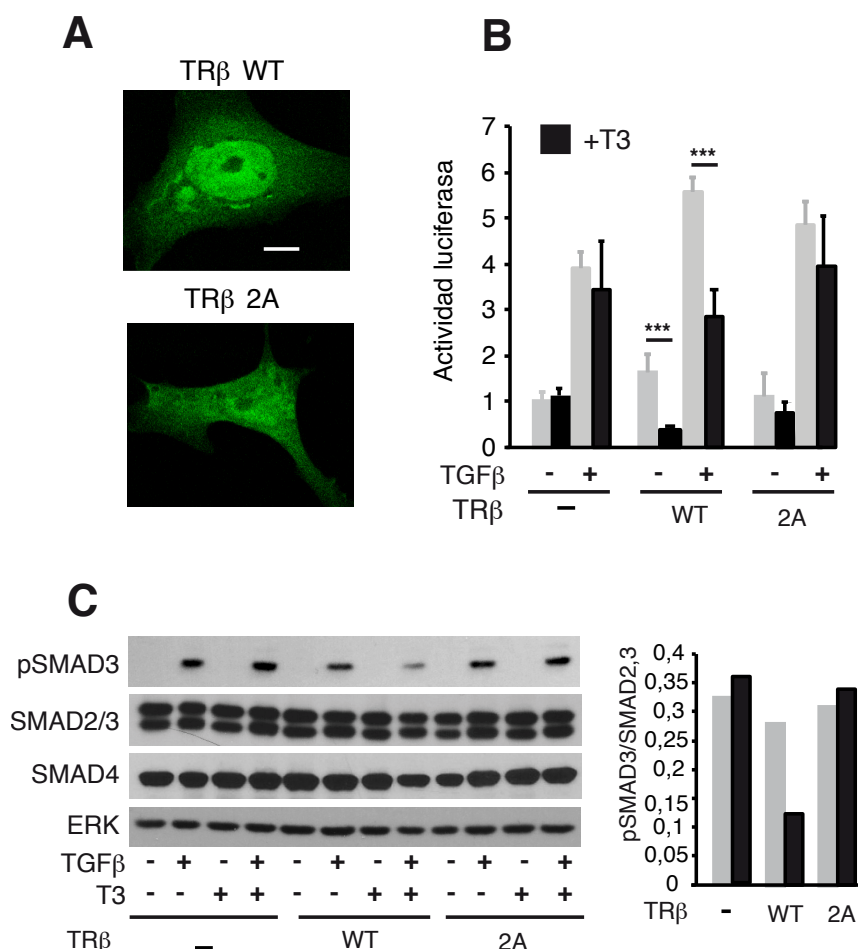


**Figura 19. La T3 inhibe la fosforilación de SMAD2 y la acumulación nuclear de SMAD en las células HepG2-TR $\beta$ .** (A) Las células parentales HepG2, así como las células HepG2-TR $\beta$ , que expresan el TR $\beta$  de forma estable, fueron incubadas con T3 (5 nM) durante 36 horas y con TGF $\beta$  (10 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se obtuvieron extractos celulares totales y se llevaron a cabo Western blots con anticuerpos para fosfo-SMAD2 (pSMAD2), SMAD2/3 y SMAD4. ERK2 se usó como control de carga. (B) Se llevaron a cabo Western blots con 15  $\mu$ g de proteínas, con los mismos anticuerpos, en extractos nucleares y citoplasmáticos de células HepG2-TR $\beta$  tratadas como en el panel A. La tubulina se usó como marcador citoplasmático.

### 1.6. El TR unido a su ligando no afecta la desfosforilación nuclear de las SMADs

Hemos visto que la T3 reduce la transcripción inducida por TGF $\beta$ , lo que parece estar asociado a la disminución de la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 y de su translocación nuclear. Sin embargo, cabía la posibilidad de que la inhibición de los niveles de Smad fosforilada observada en presencia de la hormona fuese consecuencia de un aumento de su desfosforilación, ya que la fosfatasa PPM1A causa la desfosforilación de SMAD3 en el núcleo y su exportación al citoplasma (Lin *et al* 2006).

Para analizar esta hipótesis primero quisimos estudiar el efecto de la T3 si el TR no era capaz de entrar al núcleo. Para ello analizamos la respuesta transcripcional a TGF $\beta$  en células Mv1Lu transfectadas con el TR $\beta$  nativo fusionado a GFP y con un TR $\beta$  mutado (TR $\beta$ 2A) en el dominio que contiene la señal de localización nuclear (Zhu *et al* 1998). Pudimos observar que el receptor vacío transfectado era predominantemente, aunque no exclusivamente, nuclear, mientras que la predominante localización nuclear se perdía en el mutante 2A (Fig. 20A). Por otra parte, encontramos que el antagonismo, dependiente de T3, de la actividad transcripcional inducida por TGF $\beta$  no tenía lugar en las células transfectadas con el mutante 2A (Fig. 20B), indicando que la translocación al núcleo del TR es necesaria para mediar el efecto de la T3. Sin embargo, este mutante seguía manteniendo cierta estimulación transcripcional independiente de ligando. Paralelamente, mediante análisis de Western blot encontramos que los niveles de pSMAD3 disminuían en presencia de T3 en las células Mv1Lu transfectadas con el TR $\beta$  nativo, pero no en las células transfectadas con un vector vacío o con el mutante TR $\beta$ 2A. En ningún caso existieron cambios en los niveles totales de SMAD2/3 y de SMAD4 (Fig. 20C). Los niveles de pSMAD3 no aumentaron en las células transfectadas con los receptores vacíos, pero esto se puede explicar debido a la baja eficiencia de transfección de estas células (menos de un 15%), que podría hacer que el efecto del TR no fuese apreciable.

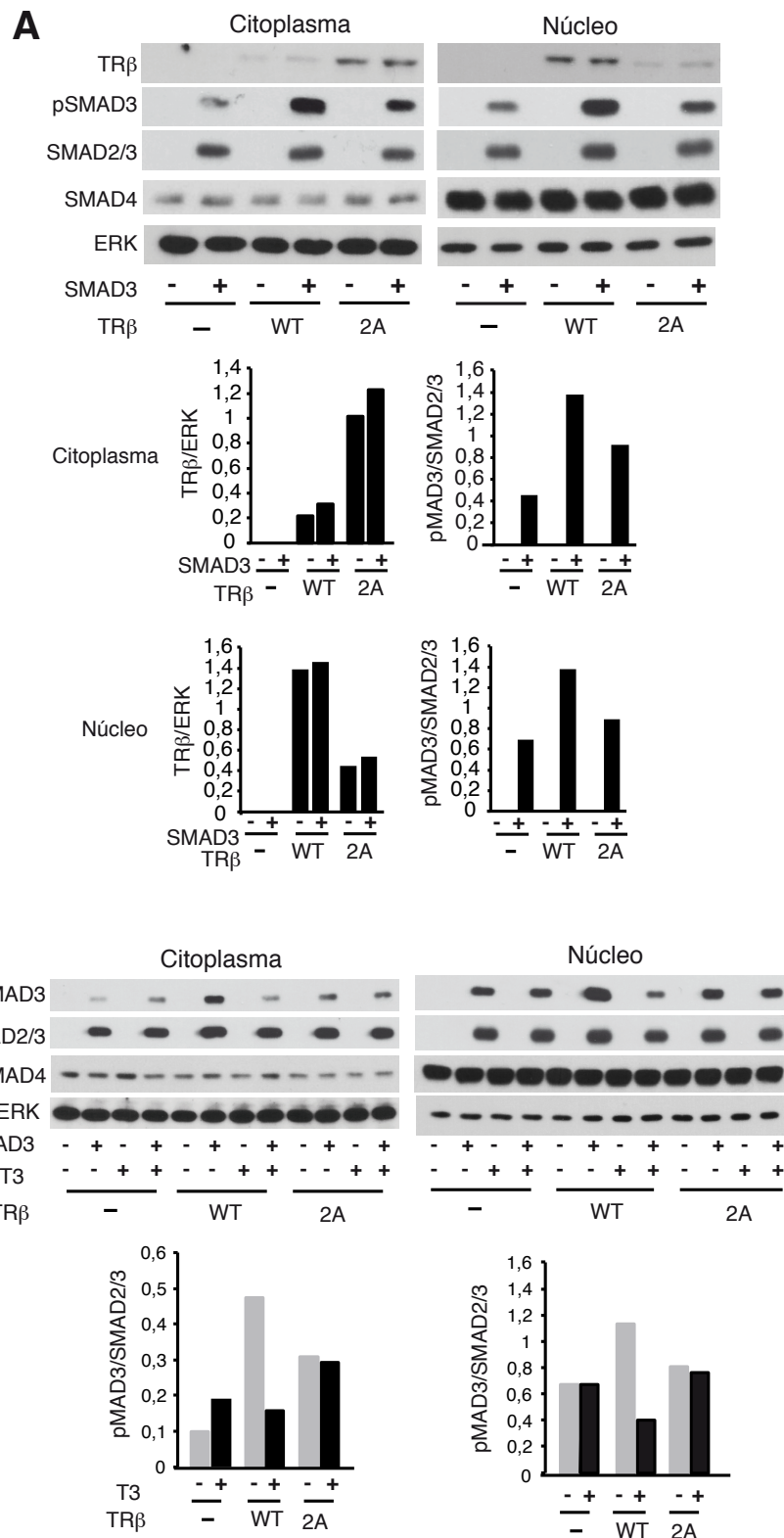


**Figura 20. La translocación nuclear del TR es necesaria para mediar el antagonismo por la T3.** (A) Imágenes confocales representativas de las células Mv1Lu transfectadas con el TRβ nativo fusionado a GFP y con el mutante del TRβ en la señal de localización nuclear (TRβ2A). La barra de escala es de 10 μM. (B) Las células fueron transfectadas con un vector vacío o con el vector para TRβ o TRβ2A. La actividad luciferasa se midió tras la incubación con T3 durante 36 horas y con TGFβ durante las últimas 5 horas. (C) Análisis mediante Western blot de pSMAD3, SMAD2/3 total, SMAD4 total y ERK2 en células transfectadas con el vector vacío, el TRβ nativo o el TRβ2A tratadas con T3 durante 36 horas y con TGFβ en los últimos 30 minutos, según se indica. El panel derecho representa la relación pSMAD3/SMAD2,3 en los distintos grupos de células tratadas con TGFβ.

Puesto que con las células Mv1Lu obtuvimos una baja eficiencia de transfección, también analizamos el efecto del TRβ y del TRβ2A cotransfectándolos con SMAD3 en células Cos-1 que tienen una mejor eficiencia de transfección. En las células Cos-1, también se observó la distribución principalmente citoplasmática del receptor 2A y predominantemente nuclear del receptor nativo (Fig. 21A). En este caso se vio que los receptores vacíos incrementaban los niveles de pSMAD3, principalmente en el citoplasma, aunque el TRβ nativo tenía un efecto mayor. Estos datos estarían de acuerdo con la idea de que, al menos cuando se sobreexpresa, el TR puede inducir un efecto independiente de ligando sobre la actividad transcripcional mediada por TGFβ

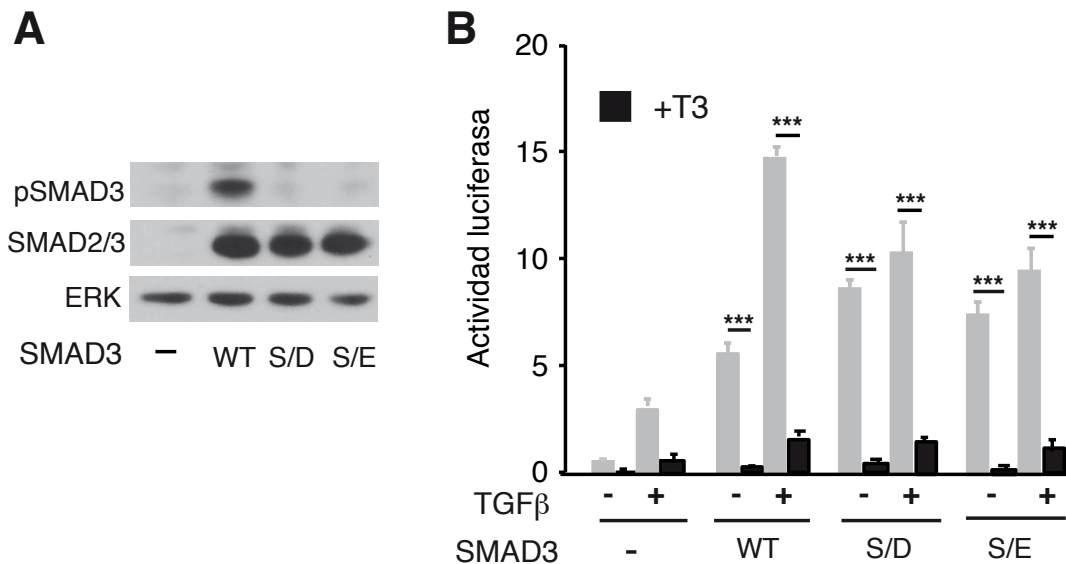
## RESULTADOS

(Fig. 21A). Observamos de nuevo que la T3 reducía la fosforilación de SMAD3, tanto en el núcleo como en el citoplasma, en las células que expresan el receptor nativo, pero esta inhibición no se observó en las células transfectadas con el mutante 2A (Fig. 21B), confirmando los datos obtenidos en las células Mv1Lu.



**Figura 21. Se requiere la localización nuclear del TR para la inhibición de la fosforilación de SMAD dependiente de T3.** (A) Análisis mediante Western blot del TR $\beta$ , fosfo-SMAD3 (pSMAD3), SMAD2/3, SMAD4 y ERK2 en extractos citoplasmáticos y nucleares de células Cos-1 transfectadas con vectores de expresión para SMAD3, TR $\beta$  o TR $\beta$ 2A (mutante en la señal de localización nuclear). En los paneles inferiores se muestran las cuantificaciones de las relaciones TR/ERK y pSMAD3/SMAD2,3 tanto en el núcleo como en el citoplasma. (B) Niveles de pSMAD3, SMAD2/3, SMAD4 y ERK2 en extractos nucleares y citoplasmáticos de células Cos-1 transfectadas con vectores de expresión para SMAD3 y TR $\beta$  o TR $\beta$ 2A tratadas con o sin T3 5 nM durante 36 horas. Se muestran las cuantificaciones en los paneles inferiores.

Tras comprobar que la localización nuclear del receptor de hormonas tiroideas es necesaria para que la T3 ejerza su efecto inhibitorio, analizamos si la hormona podía regular la desfosforilación en el núcleo. Para ello, comparamos el efecto de la T3 en células Mv1Lu cotransfectadas con TR $\beta$  y un vector de expresión para SMAD3 nativo o para dos mutantes de éste en el motivo de fosforilación C-terminal SXS (S/D y S/E). Estas mutaciones deberían dar lugar a un SMAD3 constitutivamente activo, ya que mimetizan la fosforilación y no pueden ser diana de la fosfatasa PPM1A (Dissmeyer y Schnittger 2011, Shen *et al* 2014). Tanto la forma nativa como los mutantes de SMAD se expresaron a niveles similares, pero, como era de esperar, su fosforilación sólo se detectó en células transfectadas con el SMAD3 nativo (Fig. 22A), ya que los mutantes no son fosforilables. Observamos que los mutantes S/D y S/E actuaban, efectivamente, de forma constitutiva, ya que se vio una inducción de la transcripción del plásmido reportero, que contenía elementos SBE, en ausencia de fosforilación. Además, el TGF $\beta$  aumentaba aún más la activación transcripcional en las células transfectadas con el SMAD nativo, pero este factor apenas tenía efecto en las células transfectadas con los mutantes de SMAD. Adicionalmente, la T3 seguía siendo capaz de reducir la actividad transcripcional inducida por ambos mutantes (Fig 22.B), indicando que la desfosforilación de SMAD3 por PPM1A, u otras fosfatasas, no parece jugar un papel relevante en el efecto antagónico de la hormona.



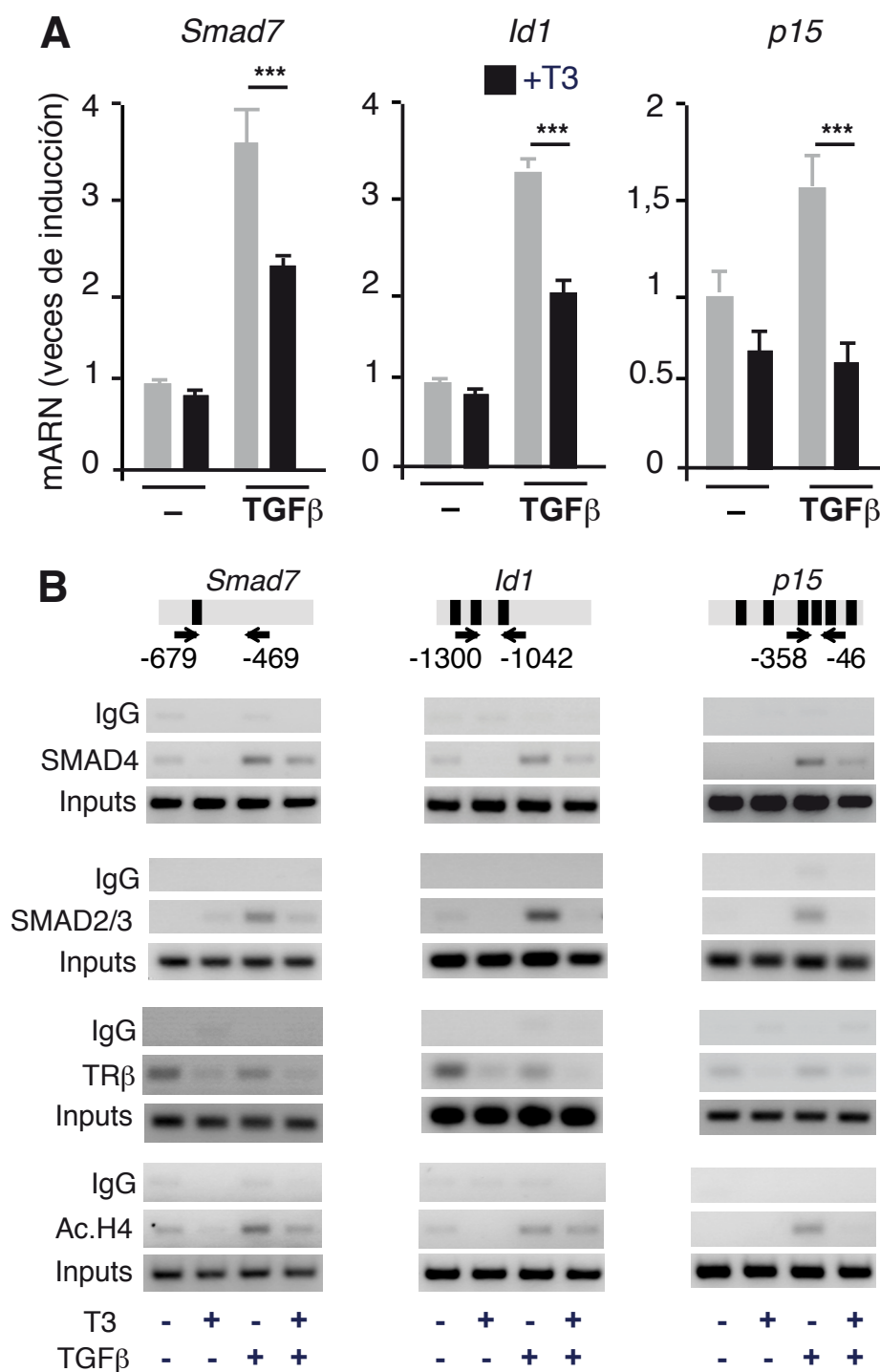
**Figura 22. La T3 no disminuye la fosforilación de SMAD3 por aumento de su desfosforilación.** (A) Análisis mediante Western blot en células Mv1Lu transfectadas con SMAD3 y sus mutantes del motivo SXS (S/E y S/D) con anticuerpos para pSMAD2, SMAD2/3 y ERK. (B) Ensayos de luciferasa en células Mv1Lu cotransfectadas con vectores de expresión para el TRβ y para el SMAD3 nativo o los mutantes. Tras la transfección, las células fueron incubadas con o sin T3 durante 24 horas y con TGFβ durante las últimas 5 horas. Los resultados de la actividad luciferasa se muestran como medias  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes y están expresados como valores relativos al obtenido en las células sin tratar transfectadas con el vector vacío. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con y sin T3 tras un análisis con un test ANOVA.

### 1.7. La T3 inhibe el reclutamiento de las SMADS a los promotores de los genes diana del TGFβ

Los datos expuestos hasta ahora demostraban que la T3 antagoniza la transactivación por TGFβ de plásmidos reporteros que contienen sitios SBE. El siguiente paso fue confirmar que la hormona también podía inhibir la expresión endógena de genes diana del TGFβ. Transcritos de tres genes diana del TGFβ ampliamente descritos, *Smad7*, *Id1* y *p15* fueron analizados mediante PCR cuantitativa en células GH4C1. Su expresión se indujo por el factor de crecimiento y esta inducción se vio claramente disminuida en las células tratadas también con T3 (Fig. 23A). Posteriormente analizamos la posibilidad de que la T3 pudiese inhibir el reclutamiento de las SMADS a sus promotores. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con las regiones de estos promotores que contienen elementos SBE (Feng *et al* 2000, Von Gersdorff *et al* 2000, Liang *et al* 2009), observamos que, como era de esperar, el reclutamiento de SMAD2/3 y de SMAD4 a estas regiones se inducía por TGFβ y que esta unión se veía significativamente atenuada en presencia de T3 (Fig. 23B). También pudimos confirmar que el TRβ parecía estar unido a estas



regiones en las células sin tratar. Esta unión se mantiene en las células tratadas con TGF $\beta$ , mientras que el receptor se libera al tratar las células con la hormona. Ya que el reclutamiento de histonas acetiltransferasas juega un papel crucial en las respuestas transcripcionales de TGF $\beta$ /SMAD, también examinamos la acetilación de la histona 4 (H4) en los promotores estudiados. De acuerdo con lo descrito (Massagué *et al* 2005), el TGF $\beta$  aumentó la abundancia de la H4 acetilada en dichas regiones, pero este incremento se vio revertido en presencia de T3 (Fig. 23B).



**Figura 23. La T3 reprime la estimulación por TGFβ de sus genes diana e inhibe el reclutamiento de las SMADs a sus promotores.** (A) Los niveles de los transcritos de *Smad7* y *p15* fueron determinados mediante PCR cuantitativa en células GH4C1 tratadas con T3 durante 36 horas y con TGFβ en las últimas 24 horas. La inducción temprana de *Id1* se analizó tras 1 hora de tratamiento con TGFβ. Los datos se representan como medias ± S.D. de tres experimentos independientes. Se indican las diferencias significativas, tras un análisis estadístico mediante un test ANOVA, entre las células tratadas con y sin T3. (B) Ensayos de ChIP fueron llevados a cabo con los fragmentos señalados de los genes diana del TGFβ que contienen elementos SBE. La localización de los cebadores usados se muestra con flechas y los SBE están representados por cajas negras. Las células fueron tratadas durante 1 hora con T3 50 nM y/o con TGFβ 10 ng/ml y analizadas mediante ChIP con anticuerpos para SMAD2/3, SMAD4, TRβ, histona 4 acetilada (Ac. H4) y su correspondiente IgG control en cada caso. También se muestran los inputs.

## 2. Efecto de las hormonas tiroideas en modelos de fibrosis *in vivo*

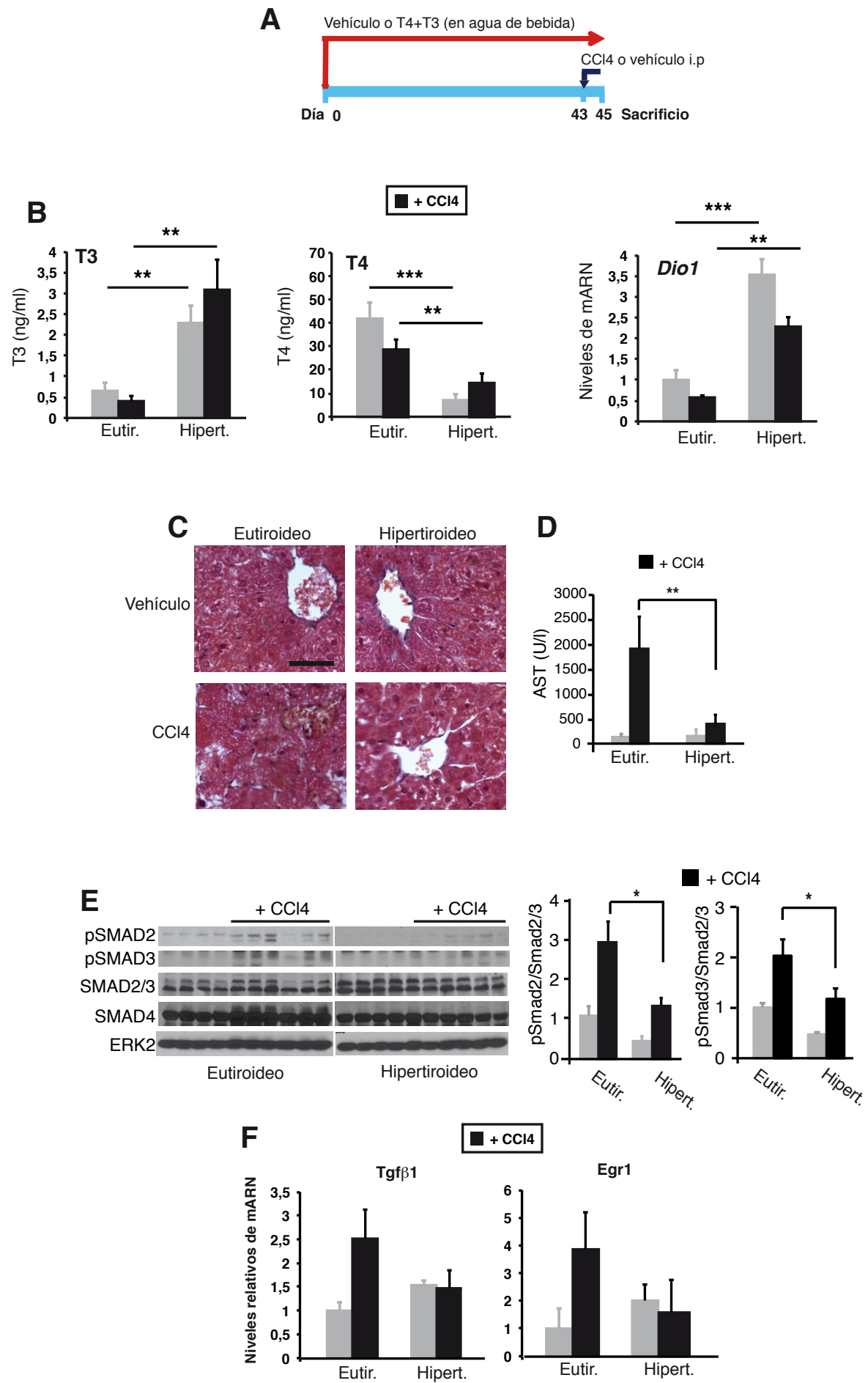
### 2.1. En respuesta al tetracloruro de carbono los ratones hipertiroides desarrollan un daño hepático agudo significativamente más leve que los eutiroides

A la vista de los resultados obtenidos indicando que la T3 puede antagonizar la transcripción inducida por TGFβ/SMAD, nos preguntamos si el tratamiento con hormonas tiroideas podría reducir la susceptibilidad de los ratones a desarrollar fibrosis “*in vivo*”, ya que el TGFβ es el principal mediador de esta patología (Brenner 2009). Para ello, en primer lugar, añadimos T3 y T4 al agua de bebida de los ratones durante un periodo de 43 días antes de la inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), un agente hepatotóxico ampliamente conocido (Fig. 24A). El tratamiento oral con hormonas tiroideas incrementó fuertemente los niveles de T3 circulantes. Puesto que la T3 inhibe la liberación de TSH por la hipófisis y bloquea la secreción endógena del tiroides (Obregon *et al* 1979), también se administró T4 a los ratones para mantener los niveles de esta hormona, aunque éstos estaban aún por debajo del rango normal. El incremento de los niveles circulantes de la hormona activa T3, así como el incremento de la expresión hepática de la desyodasa 1 (*Dio1*), un marcador funcional muy preciso de la condición tiroidea (Zavacki *et al* 2005), muestra que, como se había descrito previamente (Obregon *et al* 1979), el tratamiento oral con hormonas tiroideas induce un hipertiroidismo funcional en ratones (Fig 24B).

Como se puede apreciar en la figura 24C, el tratamiento con CCl<sub>4</sub> durante 48 horas provocó una necrosis relevante de los hepatocitos que rodean las venas centrolobulillares en los ratones eutiroides. Sin embargo, este daño no se observó en los ratones hipertiroides (Fig. 24C). Esta disminución del daño hepático en los ratones tratados con hormonas tiroideas fue confirmada por una fuerte reducción de la inducción de la actividad de la aspartato

aminotransferasa (AST) que tiene lugar como consecuencia de la administración del CCl<sub>4</sub> (Fig. 24D). Tras el daño hepático agudo, el TGF $\beta$  aumenta la fosforilación de SMAD2/3, lo que desata la deposición de matriz extracelular y el desarrollo de fibrosis hepática si la exposición al agente hepatotóxico es crónica (Yoshida y Matsuzaki 2012). El tratamiento con hormonas tiroideas disminuyó los niveles de pSMAD2 y de pSMAD3 antes y después de la inyección de CCl<sub>4</sub>. La cuantificación de la relación pSMAD/SMAD2,3 confirmó la reducción de la activación de SMAD2 y SMAD3 por este agente en los hígados hipertiroideos (Fig. 24E). Además, la inducción de la expresión de los mARNs de *Tgf $\beta$ 1* y de *Egr-1* en los ratones eutiroideos que tiene lugar tras el daño hepático agudo inducido por el tratamiento con CCl<sub>4</sub> (Pritchard *et al* 2010), se vio inhibida en los ratones hipertiroideos (Fig. 24F). Con estos datos se demuestra una reducción temprana de la respuesta a CCl<sub>4</sub> en los animales hipertiroideos comparados con aquellos que no han sido sometidos al tratamiento con hormonas.

## RESULTADOS



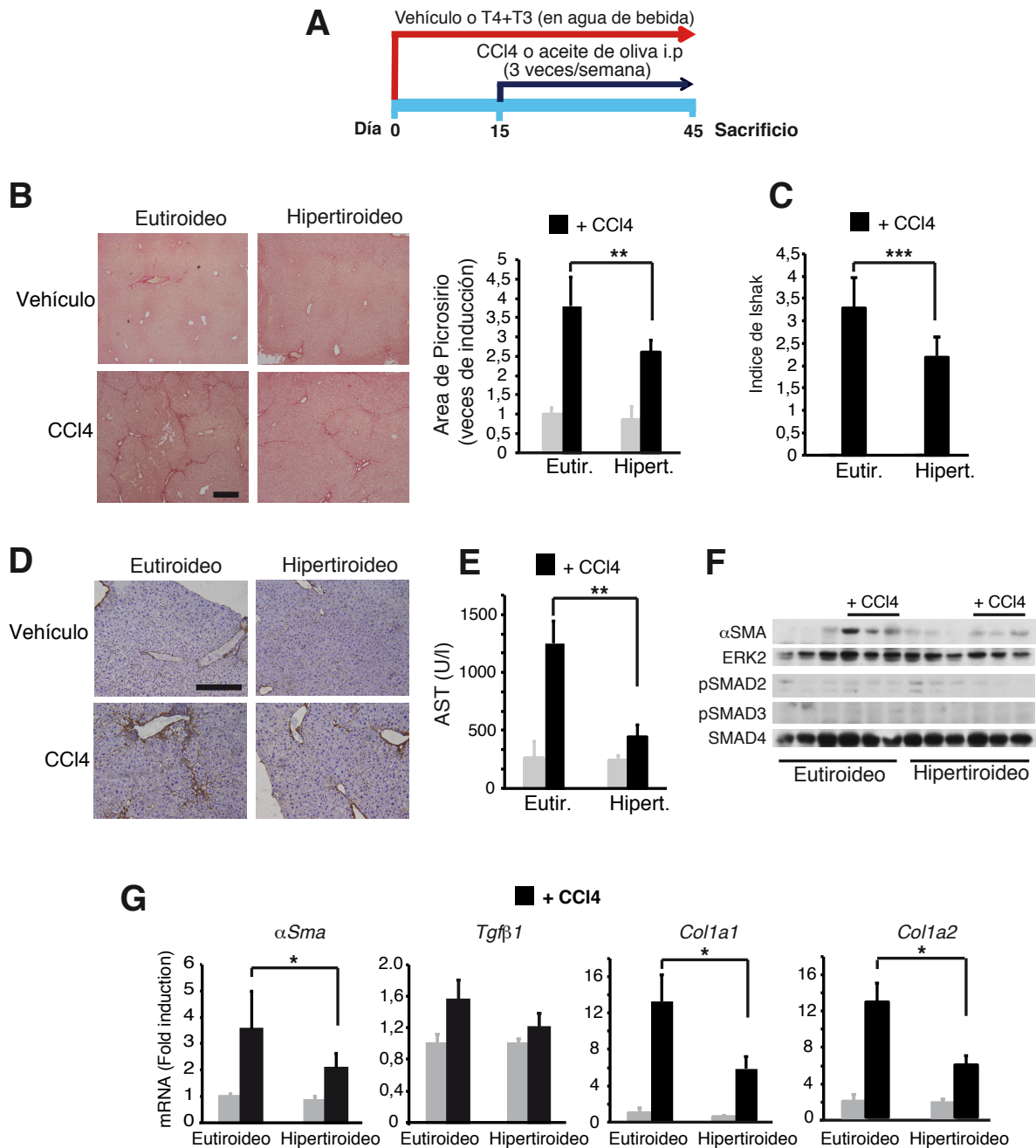
**Figura 24. La administración oral de hormonas tiroideas disminuye la respuesta hepática al tratamiento agudo con CCl<sub>4</sub> en ratones.** (A) Esquema de los tratamientos (vehículo, n=4; CCl<sub>4</sub>, n=6) en ratones macho de 6-8 semanas al inicio del experimento. (B) Niveles circulantes de T3 y T4 y niveles hepáticos de mRNA de *Dio1* en ratones tratados de forma crónica con hormonas tiroideas (T3 y T4) y con CCl<sub>4</sub> 48 horas antes de su sacrificio. Los resultados se muestran como la medias  $\pm$  S.E.M. (C) Imágenes representativas de tinciones con tricrómico de Masson de los hígados de los diferentes grupos experimentales mostrando que el CCl<sub>4</sub> causa un daño extenso con pérdida de núcleos en los hepatocitos que rodean las venas centrolobulillares en los ratones eutiroideos pero no en los hipertiroideos. La barra de escala es de 50  $\mu$ m. (D) Actividad AST en el suero de los diferentes grupos. Los datos se muestran como medias  $\pm$  S.E.M. y se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los ratones eutiroideos e hipertiroideos tratados con CCl<sub>4</sub> tras un análisis estadístico mediante ANOVA. (E) Western blot de pSMAD2, pSMAD3, SMAD2/3 y SMAD4 en los hígados tras el tratamiento con CCl<sub>4</sub>. ERK2 se usó como control adicional de carga. En el panel de la derecha se muestra la relación pSMAD2/SMAD2,3 y pSMAD3/SMAD2,3 (medias  $\pm$  S.E.M.) de las cuantificaciones de los Western blots. (F) Niveles de mRNA de *Tgf $\beta$ 1* y *Egr-1* en los mismos grupos. Los niveles de los transcritos se muestran como medias  $\pm$  S.E.M. y están expresados de forma relativa a los valores obtenidos en los animales eutiroideos sin tratar.

## 2.2. El desarrollo de fibrosis hepática en los ratones hipertiroideos es menor que en los eutiroideos

La supresión de la respuesta inicial al daño hepático en los ratones tratados con las hormonas tiroideas sugería que este tratamiento podría prevenir el subsecuente desarrollo de fibrosis hepática en etapas posteriores. Por tanto, el siguiente paso fue llevar a cabo el mismo experimento pero, en este caso, en vez realizar un tratamiento agudo con CCl<sub>4</sub> se hizo un tratamiento crónico durante 30 días, mediante la inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> tres veces por semana (Fig. 25A). Pudimos observar que los ratones hipertiroideos desarrollaban una fibrosis en el hígado menos severa que los ratones eutiroideos tras el tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Esta diferencia quedo evidenciada con una tinción histológica con rojo Picrosirio, que marca las fibras de colágeno, en la que se observó un área positiva claramente menor en los hígados de los ratones hipertiroideos (Fig. 25B). Estos animales, también presentaban un Índice de Ishak, que mide la severidad de la fibrosis hepática, más bajo que los eutiroideos (Fig. 25C). Para confirmar estos datos, se realizó una tinción inmunohistoquímica de Colágeno I obteniendo el mismo resultado (Fig. 25D). Asimismo, se valoró la actividad AST, encontrándose ésta disminuida en los ratones hipertiroideos (Fig. 25E). De acuerdo con esta reducción en el grado de severidad de la fibrosis, la inducción de  $\alpha$ -SMA, el marcador de miofibroblastos por excelencia, se vio significativamente reducida en los ratones hipertiroideos tratadas con CCl<sub>4</sub> (Fig. 25F). Estos hallazgos se confirmaron mediante RT-PCR cuantitativa mostrando que los niveles de mRNA de  $\alpha$ -Sma eran menores en los ratones tratados con hormonas. Además, este tratamiento disminuyó la expresión de marcadores fibróticos clave como son los genes de *Col1a1* y *Col1a2*, mientras que, a este tiempo, ya no

## RESULTADOS

encontramos un descenso significativo en los niveles de *Tgfb1* (Fig. 25G). La fosforilación de las SMADs tampoco estaba ya elevada tras el tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub> (Figura 25F).



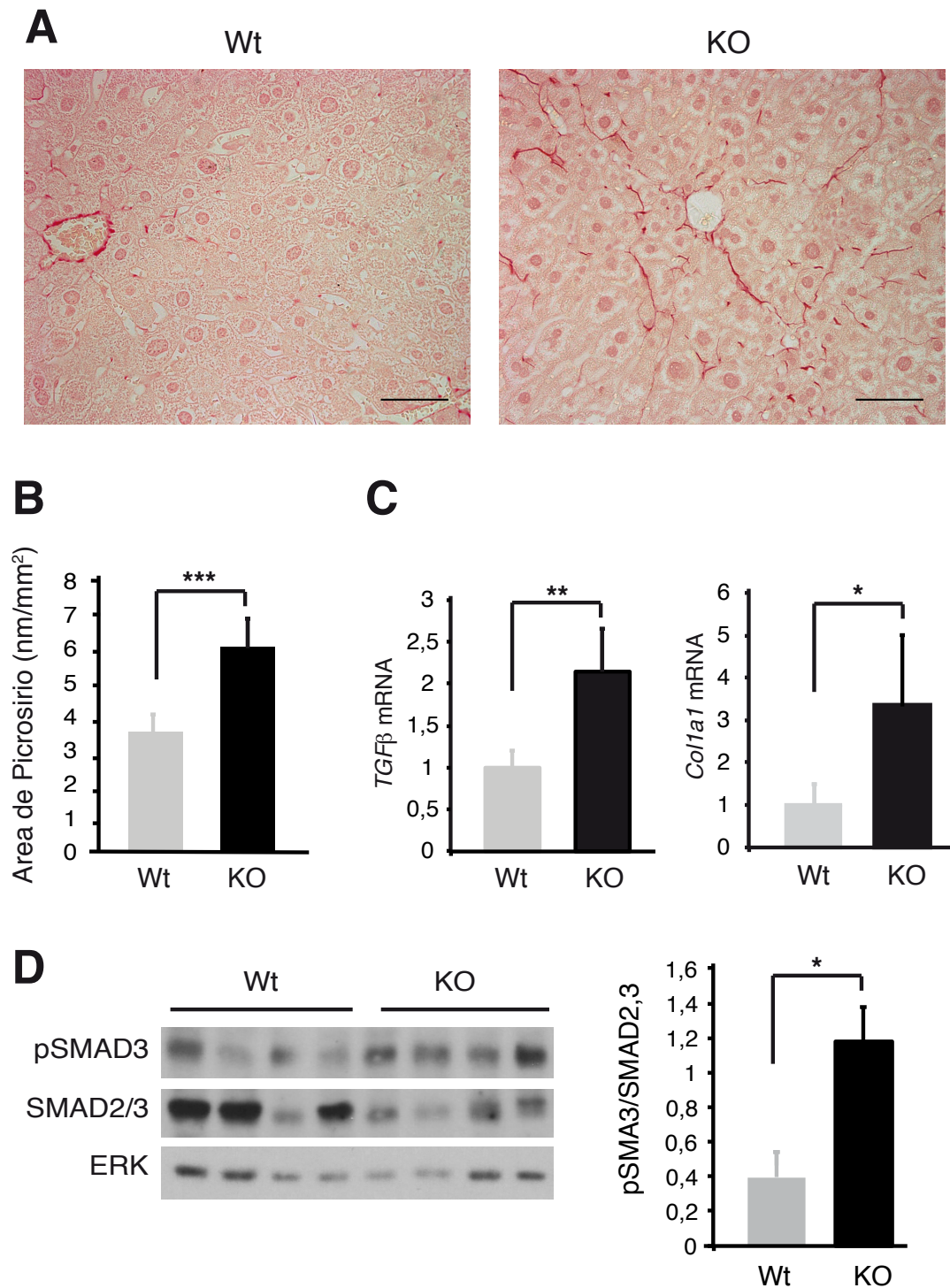
**Figura 25. La administración de hormonas tiroideas atenúa el desarrollo de la fibrosis hepática inducida por el tratamiento con CCl<sub>4</sub> en ratones.** (A) Esquema de los tratamientos (vehículo, n=4; CCl<sub>4</sub>, n=6). (B) Imágenes representativas de la tinción histológica con rojo Picrosirio de los hígados de los ratones eutiroides e hipertiroides tras el tratamiento con vehículo o CCl<sub>4</sub>. La barra de escala es de 400 μm. En el panel de la derecha se muestra la cuantificación del área teñida. Los resultados se expresan como medias ± S.E.M. (C) Medias (± S.E.M.) de los índices de Ishak obtenidos a partir de las mismas muestras. (D) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica con Colágeno I en los distintos grupos. La barra de escala es de 200 μm. (E) Medias ± S.E.M. de la actividad sérica de la aspartato aminotransferasa (AST) en los

diferentes grupos experimentales. (F) Western blot de  $\alpha$ -SMA, pSMAD2 y pSMAD3 en los hígados tras el tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>. ERK2 y SMAD4 se usaron como controles de carga. (G) Niveles de mRNA de los genes profibrogénicos  *$\alpha$ -Sma*, *Tgf $\beta$ 1*, *Col1a1* y *Col1a2*. Los resultados se muestran como las medias  $\pm$  S.E.M. relativas a la obtenida en los ratones eutiroideos tratados con vehículo. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con CCl<sub>4</sub> eutiroideos e hipertiroideos, tras un análisis ANOVA.

### **2.3. La falta de expresión de los receptores de hormonas tiroideas induce una deposición de fibras de colágeno en el hígado**

El hecho de que la administración de hormonas tiroideas parece prevenir el desarrollo de fibrosis en el hígado, nos hizo preguntarnos si la falta de señalización de dichas hormonas podrían promover la fibrogenesis. Para abordar esta hipótesis, comparamos los hígados de ratones normales de 18 meses con los de ratones de la misma edad modificados genéticamente que no expresan ni el TR $\alpha$ 1 ni el TR $\beta$  (TR KO), las dos isoformas principales de los TRs que unen hormonas tiroideas. Todos los ratones TR KO exhibían una deposición de colágeno espontánea en el hígado, puesta de manifiesto mediante una tinción rojo Picrosirio, que no se apreció en ninguno de los hígados de los ratones control (Fig. 26A y B). Las fibras de colágeno estaban presentes fundamentalmente en los espacios perisinusoidales o espacios de Disse, un patrón característico de las etapas iniciales de la cirrosis en las patologías humanas del hígado. Estos hallazgos histológicos fueron confirmados por el aumento de la expresión hepática de genes profibróticos como el *Tgf $\beta$ 1* y el *Col1a1* en los ratones deficientes de TRs (Fig. 26C). Además, la relación pSMAD3/SMAD2,3 se vio incrementado en los hígados de los ratones doble KO para los TRs (Fig. 26D), reforzando la idea de que la regulación de la actividad de las SMADs por las hormonas tiroideas puede jugar un papel en el fenotipo fibrótico encontrado en los ratones deficientes de TRs.





**Figura 26. La delección genética de los TRs provoca una deposición de colágeno espontánea en el hígado de ratones mayores.** (A) Tinción con rojo Picrosirio en cortes representativos de hígados de ratones control (n=9) y ratones TR KO (n=5) machos y hembras deficientes en TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$ , las isoformas de los receptores que unen hormonas tiroideas. La barra de escala es de 50  $\mu$ m. (B) Cuantificaciones (medias  $\pm$  S.E.M.) del área teñida con rojo Picrosirio en cada grupo. (C) Niveles de mRNA de *Tgfβ1* y *Col1a1* en ambos grupos. (D) Western blot de pSMAD3, SMAD2/3 y ERK en los hígados de los ratones control (Wt) y de los KO. En el panel de la derecha se representa la relación pSMA3/SMAD2,3 tras las cuantificaciones de los Western blots de cinco animales controles y cinco KO. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y KO tras un análisis estadístico con el test t-Student.

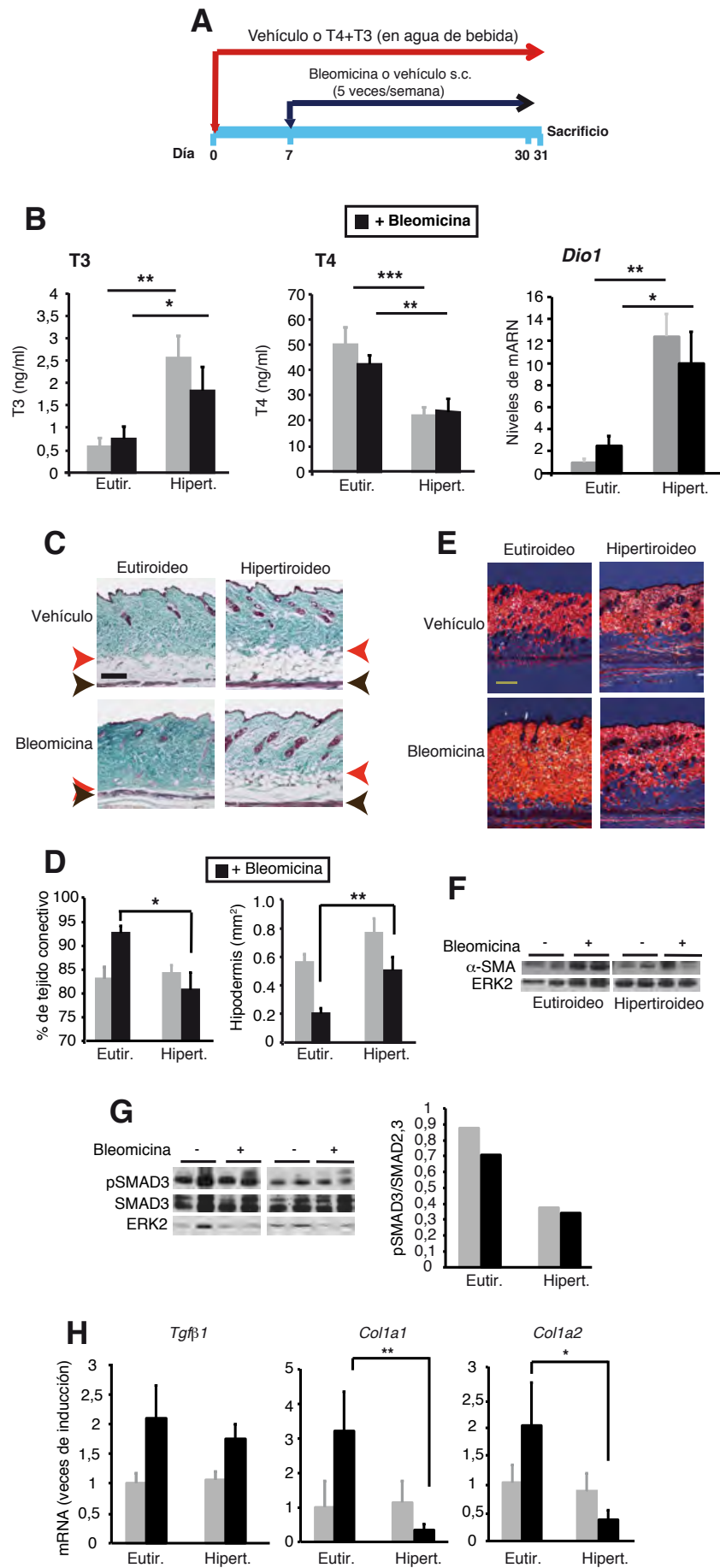


## 2.4. Las hormonas tiroideas reducen el desarrollo de la fibrosis cutánea

Nuestro siguiente objetivo fue analizar si el efecto inhibitor de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo de la fibrosis se daba en otros tejidos además de en el hígado. Por ello, usamos también un modelo de esclerodermia (Fig. 27A) inducida por inyecciones repetidas de bleomicina de forma subcutánea (Yamamoto *et al* 1999), en el que la señalización dependiente de SMAD juega un papel crucial (Lakos *et al* 2004, Takagawa *et al* 2003, Yamamoto *et al* 1999). El tratamiento con hormonas tiroideas causó el esperado aumento de T3 circulante y la reducción de T4, así como la inducción de los niveles hepáticos de mRNA de *Dio1* (Fig. 27B).

En las áreas en las que se inyectó la bleomicina se observó un incremento significativo del grosor de la dermis, que fue mucho menos evidente en los ratones tratados con hormonas tiroideas. En los ratones control, estas áreas muestran una gran acumulación de fibras de colágeno en la dermis que se extiende infiltrándose en la hipodermis y destruyendo el tejido adiposo (Fig. 27C). La cuantificación de las imágenes muestra un aumento significativo del tejido conectivo dérmico con la consecuente reducción del área hipodérmica en los ratones eutiroideos, pero esto no se observó en los ratones hipertiroideos (Fig. 27D). Además, la observación de la tinción de rojo Picrosirio bajo luz polarizada mostraba una alta compactación de las fibras de colágeno en la dermis de los ratones control tratados con bleomicina. Este patrón de polarización es característico del aumento de colágeno en las áreas fibróticas. Las fibras de colágeno eran muy gruesas y compactas en estos animales, mientras que en los cortes de los ratones hipertiroideos tratados con bleomicina se podía apreciar una disminución del grosor de las fibras de colágeno y de la deposición de matriz extracelular, así como una baja collagenización de la hipodermis (Fig. 27E). Esta reducción de la fibrosis en la piel en los ratones hipertiroideos tratados con bleomicina estaba también asociada a una reducción de la inducción de la expresión de  $\alpha$ -SMA (Fig. 27F), a una disminución en los niveles de pSMAD3 (Fig. 27G) y a una menor inducción de la expresión de los genes profibróticos *Col1a1* y *Col1a2* (Fig. 27H). Por consiguiente, de estos resultados se puede concluir que las hormonas tiroideas palian las respuestas fibróticas *in vivo* en dos modelos diferentes de fibrosis dependiente de TGF $\beta$ .

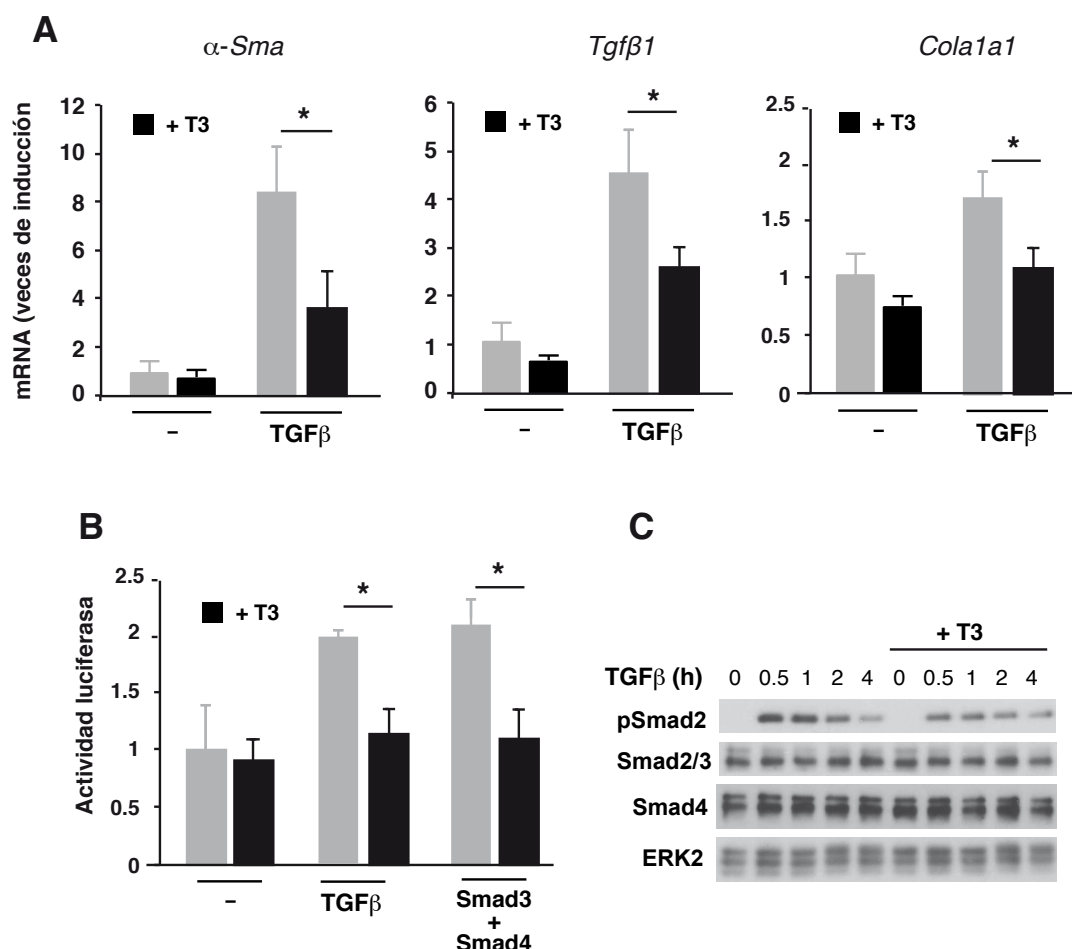
## RESULTADOS



**Figura 27. Las hormonas tiroideas atenúan la fibrosis en piel inducida por la administración de bleomicina.** (A) Esquema del modelo experimental (n=6); s.c.: subcutáneo (B) Niveles circulantes de T3 y T4, medidos mediante radioinmunoensayo, en ratones tratados o sin tratar con hormonas tiroideas y/o bleomicina. Los niveles de mRNA hepático de *Dio1* (representados como medias  $\pm$  S.E.M.) en los diferentes grupos se usaron para confirmar el hipertiroidismo. Se indican las diferencias significativas entre los ratones eutiroides e hipertiroides, tras un análisis estadístico mediante ANOVA. (C) Tinciones representativas de tricrómico de Masson de las pieles de los diferentes grupos experimentales. La flecha roja señala la unión entre la dermis y la capa de grasa subcutánea (hipodermis) y la flecha negra indica la posición del músculo. La barra de escala es de 200  $\mu$ m. (D) El porcentaje de tejido conectivo y el área de la hipodermis fueron calculados a partir de los cortes teñidos. Se muestran las medias  $\pm$  S.E.M. y se indican las diferencias significativas entre los ratones eutiroides e hipertiroides tratados con bleomicina tras un análisis estadístico mediante un test ANOVA. (E) Imágenes representativas de cortes de las pieles de los ratones de los diferentes grupos teñidos con rojo Picrosirio. Las imágenes fueron observadas con luz polarizada para apreciar mejor el colágeno. La barra de escala es de 200  $\mu$ m. (F) Western blot de  $\alpha$ -SMA en extractos de piel de los ratones de los diferentes grupos. Se usó ERK2 como control de carga. (G) Western blot de pSMAD3, SMAD2/3 y ERK. En el panel de la derecha se muestra la relación pSMAD3/SMAD2,3 de las cuantificaciones en los animales tratados y sin tratar con hormonas tiroideas y/o bleomicina. (H) Niveles de los transcritos de los genes profibróticos, *Tgf $\beta$ 1*, *Col1a1* y *Col1a2* en la piel. Se muestran las medias  $\pm$  S.E.M. de los diferentes grupos y se indican las diferencias significativas entre los ratones eutiroides e hipertiroides tratados con bleomicina tras un análisis estadístico con un test ANOVA.

## 2.5. Las hormonas tiroideas inhiben la señalización por TGF $\beta$ en fibroblastos

Debido a que las células tipo fibroblasto son los efectores primordiales en el desarrollo de la fibrosis, para terminar esta parte del trabajo quisimos examinar la posibilidad de que la T3 pudiese inhibir directamente la respuesta a TGF $\beta$  en cultivos primarios de fibroblastos. Utilizando fibroblastos embrionarios de ratón pudimos observar que los transcritos de  *$\alpha$ -Sma* eran fuertemente estimulados por el TGF $\beta$  y que esta respuesta se veía significativamente reducida en las células tratadas con T3 (Fig. 28A). Además también comprobamos que la T3 era capaz de reducir la inducción por TGF $\beta$  de otros genes profibróticos como el propio gen *Tgf $\beta$ 1* y el *Col1a1* (Fig. 28A), sugiriendo que la hormona podía regular directamente la activación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Como era de esperar, estos datos correlacionaban con una disminución por la T3 de la respuesta a TGF $\beta$  y a SMADs en ensayos de transactivación (Fig. 28B) y con una menor inducción de la fosforilación de SMAD2 por TGF $\beta$  en presencia de T3 (Fig. 28C).



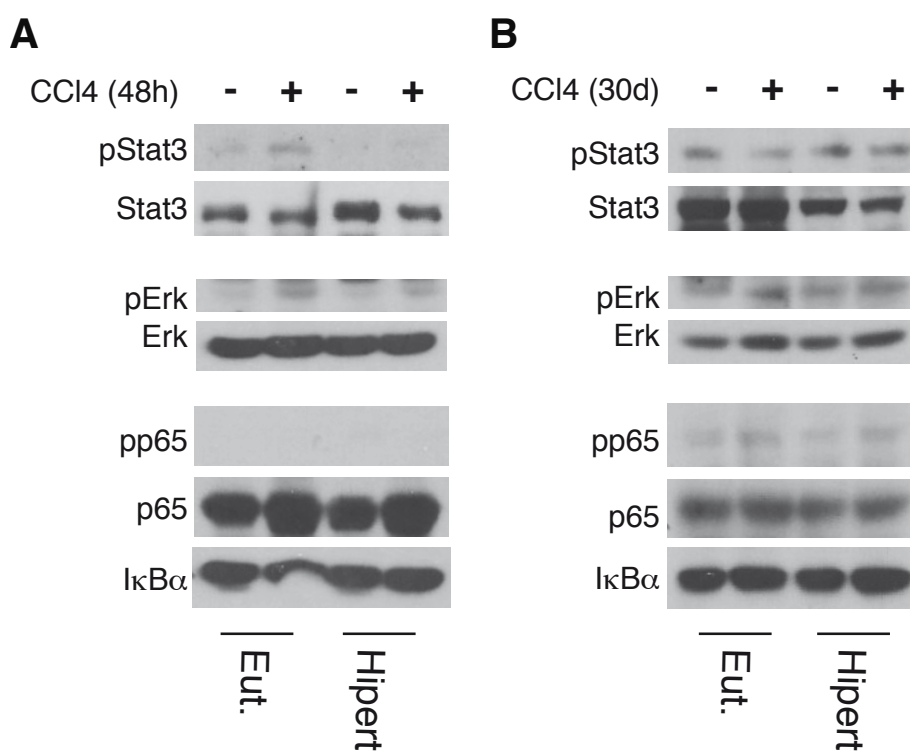
**Figura 28. La T3 antagoniza la activación de los fibroblastos por TGFβ.** (A) Los fibroblastos obtenidos de embriones de 13,5 p.c. fueron cultivados en presencia o ausencia de T3 nM durante 36 horas y con 10 ng/ml de TGFβ durante las últimas 24 horas. Se muestran las medias ± S.D. (n=3) de los niveles de mARN de *α-Sma*, *Tgfβ1* y *Cola1a1*. Los valores se expresan como veces de inducción con respecto a los obtenidos en las células sin tratar. Se muestran las diferencias significativas entre las células tratadas y no tratadas con T3 tras un análisis estadístico con un test ANOVA. (B) Las células fueron cotransfectadas con el plásmido reportero p3TP-lux y los vectores de expresión de SMAD3 (150 ng) y SMAD4 (200 ng) o con el vector vacío (-). La actividad luciferasa se midió tras el tratamiento con T3 durante 36 horas y/o con TGFβ durante las últimas 5, como se indica. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con y sin T3. (C) Extractos celulares de fibroblastos tratadas con T3 durante 36 horas y/o con TGFβ en los tiempos indicados fueron sometidos a análisis de Western blot con los anticuerpos para pSMAD2, SMAD2/3 y SMAD4. ERK2 se usó como control de carga.

### 3. Efecto de las hormonas tiroideas en la inflamación hepática

#### 3.1. Estudio de los principales marcadores de inflamación en los modelos de fibrosis hepática estudiados

Ya que la inflamación durante las primeras etapas de los procesos fibróticos también juega un importante papel en su desarrollo (Bataller y Brenner 2005), en la tercera parte del trabajo nos propusimos examinar el estado de los marcadores inflamatorios en los modelos de

fibrosis hepática estudiados. Para ello analizamos mediante Western blot los hígados de los grupos experimentales de los modelos de administración de CCL4 aguda y crónica descritos en las figuras 24A y 25A. Estudiamos las rutas de señalización de dos de los principales mediadores del proceso inflamatorio, la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Tras el tratamiento agudo con el CCL4, vimos como se producía una activación del factor de transcripción Stat3, ya que aumentaba su fosforilación en los ratones eutiroides. Sin embargo no se apreció esa activación en los ratones hipertiroideos (Fig. 29A). Observamos algo parecido con la ruta de las MAPKs, con un aumento de la fosforilación de su efector Erk en los ratones eutiroides tratados con CCL4, siendo este aumento más sutil en los hipertiroideos (Fig. 29A). En cuanto a la ruta del TNF $\alpha$  no se apreció ninguna activación de su principal efector, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, medida como fosforilación de la subunidad p65 o como desaparición de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Sin embargo, al analizar los hígados de los ratones que habían estado sometidos al tratamiento con CCL4 de forma crónica, ya no se apreciaba ni siquiera activación de Stat3 o Erk (Fig. 29B). Esto puede ser debido a la larga duración del tratamiento.

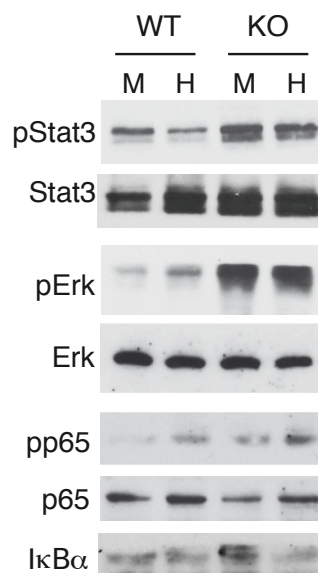


**Figura 29. Las hormonas tiroideas disminuyen la activación de Stat3 y Erk en hígados de ratones tratados con CCL4 durante 48 horas.** (A) Western blot con extractos de los hígados de los ratones descritos en la figura 24A que fueron tratados con CCL4 durante 48 horas. Se usaron anticuerpos para pStat3, Stat3, pErk, Erk, pp65, p65 e I $\kappa$ B $\alpha$ . (B) Mismo análisis mediante Western blot pero en este caso los ratones usados han sido los descritos en la figura 25A que fueron sometidos a un tratamiento crónico con la droga. Cada carril representa un “pool” de extractos hepáticos de 4-6 animales .

## RESULTADOS

### 3.2. La delección de los receptores de hormonas tiroideas aumenta la activación basal de Stat3 y Erk

Dado que habíamos observado que la ausencia de los receptores de hormonas tiroideas inducía una deposición de colágeno espontánea, nos preguntamos si esta deficiencia también podía tener algún efecto sobre los principales mediadores de la inflamación. Para ello, usamos los ratones anteriormente descritos que no expresan ni TR $\alpha$ 1 ni TR $\beta$ . Puesto que la inflamación hepática y la carcinogénesis muestran una clara disparidad de género (Naugler *et al* 2007), utilizamos tanto machos (M) como hembras (H). Estudiamos los niveles de Stat3 total y fosforilado en los hígados de estos animales, encontrando que los niveles de pStat3 eran mayores en ambos sexos (Fig. 30A). También se observó un fuerte aumento de la fosforilación de Erk, sin cambios en los niveles totales de la MAPK, y un ligero aumento en la fosforilación p65/NF-kB con apenas cambios en el p65 total ni el I $\kappa$ B $\alpha$ , en los ratones KO comparados con los controles.

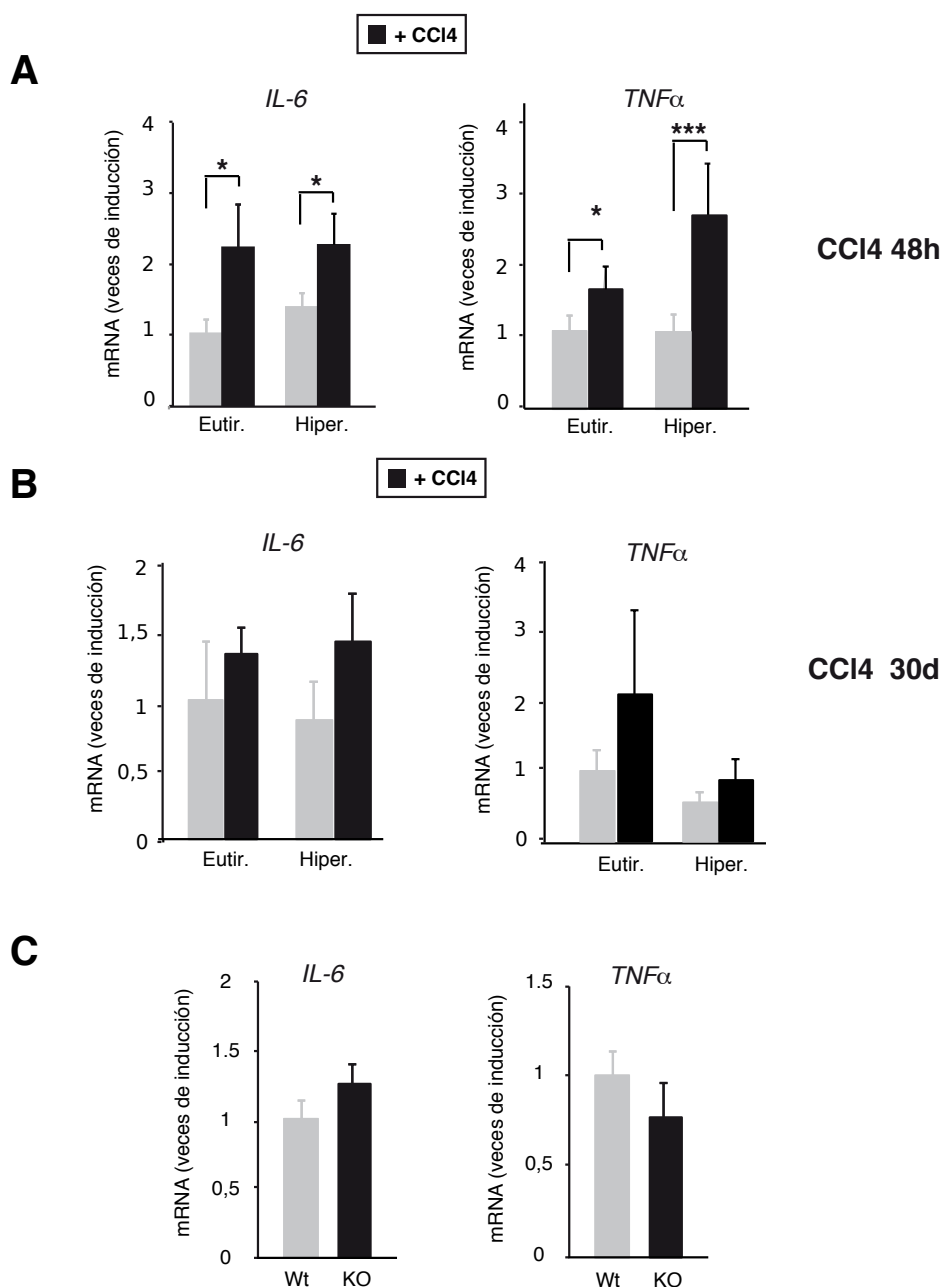


**Figura 30. La delección de los TRs incrementa la activación hepática de Stat3 y Erk.** Western blot con extractos de hígados de ratones control o KO de 18 meses de edad con los anticuerpos para pStat3, Stat3, pErk, Erk, pp65, p65 e I $\kappa$ B $\alpha$ . Se usan tanto machos (M) como hembras (H). Cada carril representa un “pool” de extractos hepáticos de 3 animales.

### 3.3. Expresión de citoquinas inflamatorias en los diferentes modelos estudiados

Dado que las diferencias observadas en la activación de las rutas estudiadas podían ser debidas a una alteración en la producción de las principales citoquinas que intervienen en el proceso, medimos los niveles de mRNA de la *IL-6* y del *TNF $\alpha$*  en los diferentes grupos

experimentales analizados. En los hígados de los ratones eutiroides tratados con tetracloruro de carbono durante 48 horas encontramos un aumento en la expresión de ambas citoquinas, como cabía esperar (Simeonova *et al* 2001). Sin embargo, no observamos unos niveles inferiores de expresión en los ratones hipertiroideos, siendo incluso superiores en el caso del *TNF $\alpha$*  (Fig. 31A). En los ratones sometidos al tratamiento crónico con tetracloruro, no se apreció ningún cambio de expresión de las citoquinas en ninguno de los grupos experimentales, ni siquiera en los ratones eutiroides tratados con CCl<sub>4</sub>, en línea con la ausencia de activación observada en los análisis de Western blot (Fig. 31B). Sorprendentemente, tampoco obtuvimos ninguna diferencia en los ratones KO para los TRs en comparación con los ratones controles (Fig. 31C), a pesar de la mayor activación hepática de Stat3 o Erk .

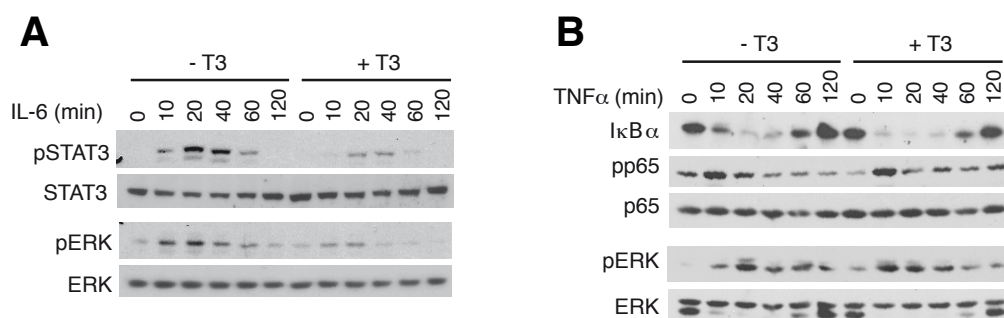


## RESULTADOS

**Figura 31. Los niveles de mRNA de las principales citoquinas no están alterados en los ratones hipertiroideos ni en los KO para los TRs.** (A) Niveles de mRNA de las citoquinas *IL-6* y *TNF $\alpha$*  en los hígados de los ratones descritos en la figura 24A (tratamiento agudo con CCl<sub>4</sub>). Los datos se presentan como medias  $\pm$  S.E.M. y están expresados como veces de inducción respecto a los valores obtenidos en los ratones sin tratar. Se indican las diferencias significativas tras un análisis estadístico con un test ANOVA. (B) Misma aproximación experimental pero en este caso los ratones usados fueron los descritos en la figura 25A (tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>). (C) Medida de los niveles de mRNA de las citoquinas descritas en los apartados anteriores en ratones macho control y KO para los TRs. El test usado para el análisis estadístico fue un test t-Student.

### 3.4. La T3 antagoniza la señalización por IL-6 en células de hepatocarcinoma

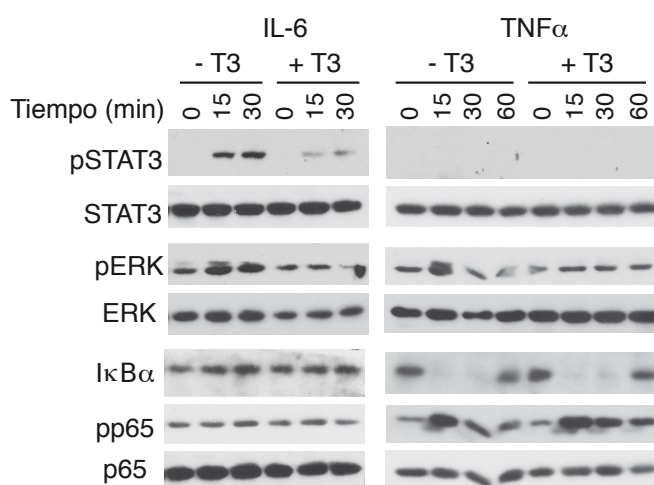
Dada la discrepancia entre la producción de citoquinas y la activación de las rutas observadas *in vivo*, pensamos que las hormonas tiroideas podían estar regulando directamente la señalización de las citoquinas en las células hepáticas. Por lo tanto, el siguiente paso fue testar el efecto de la T3 sobre la activación de STAT3 y ERK en respuesta al tratamiento con IL-6. Para ello, utilizamos cultivos de células humanas de hepatocarcinoma Hep3B. Como se puede observar en la figura 32A, en ausencia de T3, la IL-6 causa una fuerte y transitoria inducción de la fosforilación de STAT3 y de ERK. En cambio esta inducción se ve claramente reducida en las células que habían sido previamente tratadas con T3, mostrando que la hormona puede inhibir la activación por IL-6 de ambas rutas de señalización. También quisimos analizar el efecto de la T3 sobre la activación de NF- $\kappa$ B para ello tratamos las células con TNF $\alpha$ . El TNF $\alpha$  provocó una activación de ERK, una desaparición rápida y transitoria de I $\kappa$ B $\alpha$  y un aumento en la fosforilación de p65, pero la T3 no alteró significativamente la respuesta a TNF $\alpha$  (Fig 32B).



**Figura 32. La T3 antagoniza la señalización de la IL-6 en las células Hep3B.** (A) Western blots de extractos proteicos de células Hep3B pretratadas con T3 5 nM, en 10% de suero deplecionado de hormonas, durante 36 horas y después tratados con IL-6 10 ng/ml durante los tiempos indicados. Se analizaron los niveles de STAT3 y ERK fosforilados y totales. (B) Se siguió el mismo procedimiento experimental que en el apartado A pero en este caso las células se trataron con TNF $\alpha$  10 ng/ml y se analizaron las formas fosforiladas y totales de p65 además de las de ERK, así como los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ .

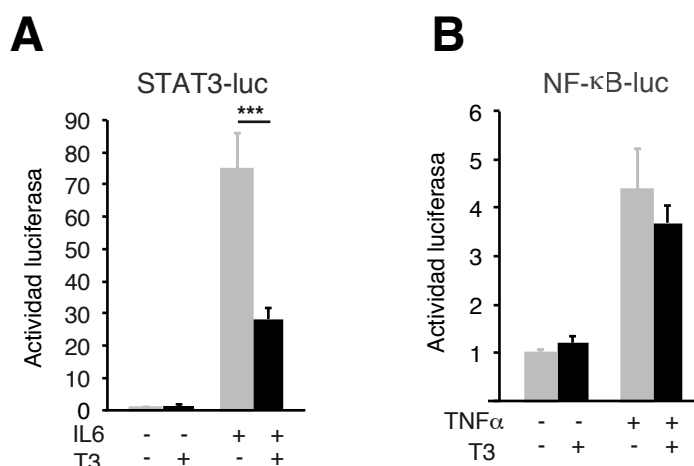


Ya que el suero podría interferir en la activación de las vías de señalización por las citoquinas y/o en el efecto de la T3, quisimos estudiar si se repetían estos mismos resultados cuando manteníamos las células en un medio muy bajo en suero (0,5%) durante los tratamientos. Nuevamente comprobamos que la T3 disminuía fuertemente la activación de STAT3 y ERK inducida por IL-6. Por otra parte, como cabía esperar, la IL-6 no causaba la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  ni la fosforilación de p65, ilustrando que esta interleuquina no activa NF- $\kappa$ B (Fig. 33). En el caso del tratamiento con TNF $\alpha$ , vimos como, de nuevo, la T3 no tenía un efecto destacable sobre la activación de NF- $\kappa$ B y que el TNF $\alpha$  no estimulaba la fosforilación de STAT3 (Fig 33).



**Figura 33. La T3 reduce la señalización mediada por IL-6 pero no por TNF $\alpha$  en células Hep3B cultivadas con 0,5% de suero.** Western blot con los anticuerpos indicados en extractos totales de proteínas de células tratadas con T3 5 nM durante 36 horas y con IL-6 (10 ng/ml) o TNF $\alpha$  (10 ng/ml) durante 15, 30 y 60 minutos en un medio suplementado con 0,5% de suero deplecionado de hormonas tiroideas.

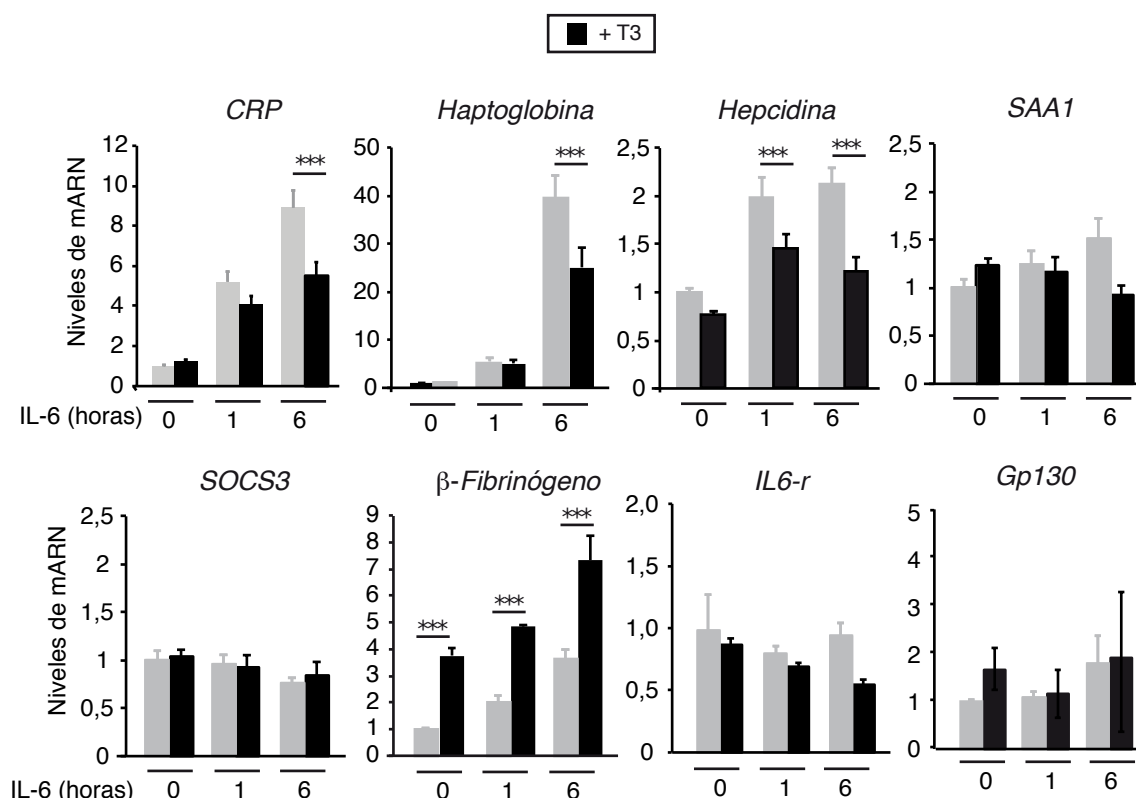
Quisimos confirmar esta inhibición de la señalización de la IL-6 por la hormona mediante otro abordaje experimental, analizando su efecto sobre la actividad transcripcional dependiente de STAT3. Para ello llevamos a cabo transfecciones transitorias en las células Hep3B con un plásmido reportero que contenía elementos de unión a STAT. Observamos que la IL-6 estimulaba fuertemente la actividad del reportero y que la T3 antagonizaba esa respuesta (Fig. 34A). Sin embargo, al transfectar las células con un reportero que contenía sitios de unión de NF- $\kappa$ B, la T3 no disminuía de forma significativa la actividad reportera inducida por el TNF $\alpha$  (Fig. 34B), de acuerdo con los análisis previos mediante Western blot en los que la activación inducida por TNF $\alpha$  no era menor en presencia de T3.



**Figura 34. La T3 reduce la actividad transcripcional inducida por IL-6 pero no por TNFα.** (A) Las células Hep3B se transfectaron de forma transitoria con un plásmido reportero que contiene elementos de unión a STAT y fueron incubadas en presencia o ausencia de T3 5 nM durante 36 horas y tratadas con IL-6 (10 ng/ml) durante las últimas 5 horas. Tras el tratamiento se midió la actividad luciferasa. (B) Actividad luciferasa de las células transfectadas con un plásmido reportero que contiene sitios de unión de NF-κB y que fueron tratadas con T3 durante 36 horas y con TNFα las últimas 5 horas. Se indican las diferencias significativas entre las células tratadas con y sin T3 tras un análisis estadístico con un test ANOVA.

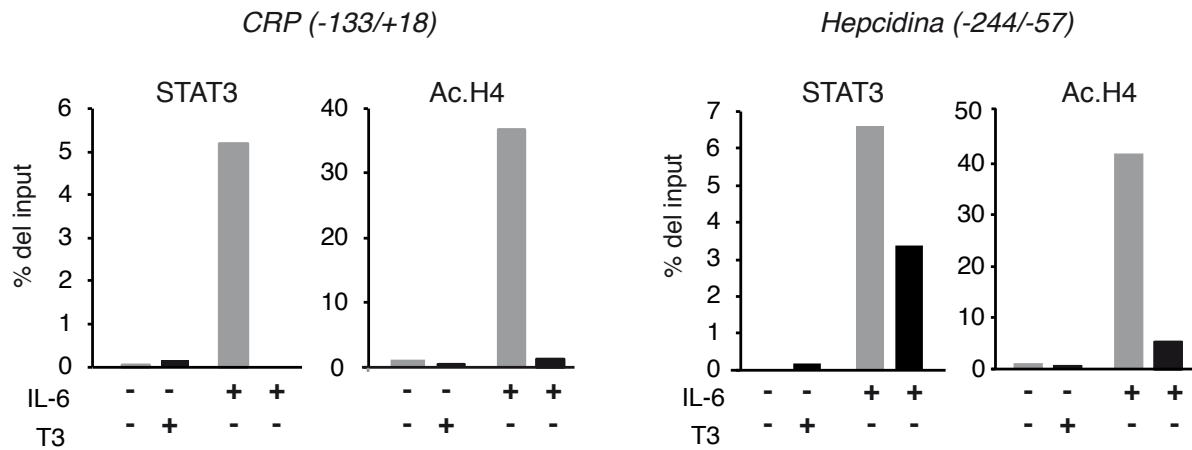
### 3.5. La T3 reprime la expresión inducida por IL-6 de genes dependientes de Stat3 disminuyendo la unión de este factor a los promotores de sus genes diana

Puesto que varios genes que codifican para las proteínas de fase aguda (APP) contienen elementos de respuesta a STAT en sus regiones reguladoras, examinamos el efecto de la T3 sobre los niveles de los transcritos de diferentes APP estimulados por IL-6. Como se muestra en la figura 35, la IL-6 provoca un aumento significativo de los niveles de mRNA de la *proteína C reactiva (CRP)*, de la *haptoglobina* y de la *hepcidina* y este incremento se ve reprimido en las células tratadas con T3. En las células Hep3B, no observamos una inducción del *SAA1* o del *SOCS3* por la IL-6, por lo que tampoco vimos ninguna alteración por la T3. Tal y como se había descrito previamente la expresión del gen de *Fibrinogéno-β* fue estimulada por la T3 (Shih *et al* 2004) y también por la IL-6 (Fig. 35). Finalmente, también estudiamos los niveles de mRNA del *receptor de IL-6 (IL6-r)* y de la subunidad *Gp130*, común a todos los receptores de tipo I de la citoquina, que es esencial para la transducción de la señal de la IL-6, por si existiese una alteración por la T3 ya a nivel del receptor, pero no observamos ningún cambio en su expresión.



**Figura 35. La T3 inhibe la inducción por IL-6 de genes dependientes de STAT.** Se muestran las medias  $\pm$  S.D. de los niveles de los diferentes transcritos indicados, determinados en las células Hep3B tratadas con 5 nM de T3 durante 36 horas y con IL-6 durante 1 o 6 horas. Se realizó un análisis estadístico mediante un test ANOVA.

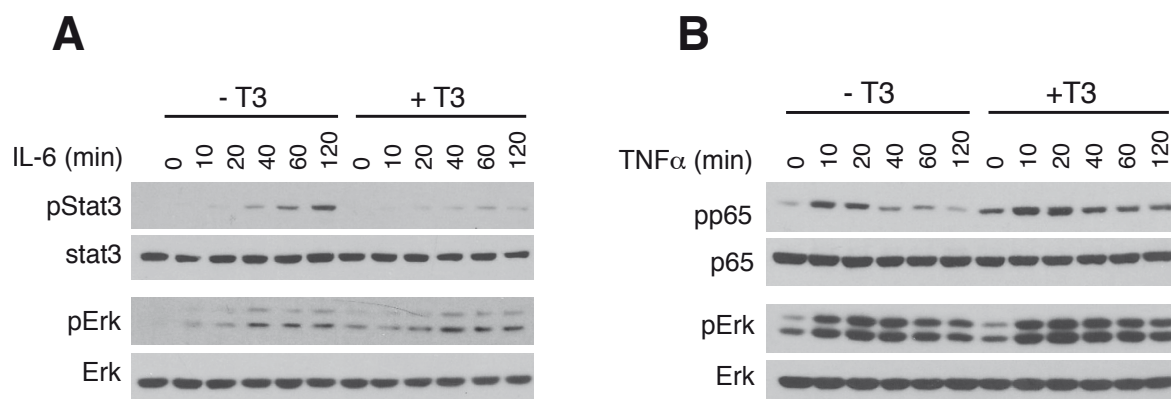
Buscando el mecanismo molecular responsable de esta inhibición transcripcional por la T3, quisimos evaluar el reclutamiento de STAT3 a los promotores de sus genes diana. Para ello, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células Hep3B que fueron tratadas con T3 durante 36 horas y/o con IL-6 y/o durante 2 horas. Las células que no habían sido sometidas a tratamiento con IL-6 no mostraron reclutamiento de STAT3 a las regiones de los promotores de los genes de *CRP* y *hepcidina* que contienen elementos de respuesta a STAT3 (Nishikawa *et al* 2008, Vittoria *et al* 2015). Sin embargo, la IL-6 estimuló la unión de STAT3 a estas regiones y la T3 redujo significativamente esta respuesta de forma concordante con la inhibición de la expresión endógena de estos genes. También analizamos la abundancia de la histona 4 acetilada (Ac. H4), un marcador de la activación de la actividad transcripcional, y vimos que seguía un patrón similar al encontrado para el STAT3, ya que la T3 también suprimía el aumento de acetilación de la histona dependiente de IL-6 (Fig. 36).



**Figura 36. La T3 inhibe el reclutamiento de STAT3 a los promotores de sus genes diana.** Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos para STAT3 y para la histona 4 acetilada (Ac. H4) en las regiones indicadas de los genes de *CRP* y *Hpcidina* en células tratadas durante 36 hora con T3 5 nM y/o con IL-6 10 ng/ml durante las últimas 2 horas. Los datos se expresan como porcentaje del input tras la resta de los valores obtenidos con su correspondiente IgG control. Se muestra un experimento de dos con resultados similares.

### 3.6 La T3 inhibe la señalización por IL-6 en macrófagos

Finalmente, dado que los macrófagos son las principales células productoras de citoquinas y juegan un papel muy importante en los procesos de inflamación, quisimos examinar el efecto de la T3 sobre la señalización de las citoquinas estudiadas, IL-6 y TNF $\alpha$ , en los macrófagos. Para utilizamos la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. En este tipo celular también pudimos observar que la T3 reducía fuertemente los niveles de pStat3 en respuesta a IL-6, aunque no así los de pErk (Fig. 37A) y que la hormona tampoco alteraba la respuesta de NF- $\kappa$ B al tratamiento con TNF $\alpha$  (Fig. 37B). Por tanto, confirmamos de este modo que la T3 también antagoniza la señalización de la IL-6 en los macrófagos.



**Figura 37. La T3 inhibe la señalización por IL-6 pero no por TNFα en los macrófagos.** (A) Las células RAW264.7 fueron tratadas con T3 5 nM durante 36 horas antes del tratamiento con 10 ng/ml de IL-6 durante diversos tiempos entre 0 y 120 minutos en medio suplementado con 10% de suero deplecionado de hormonas tiroideas. Se analizan mediante Western blot los niveles de las proteínas fosforiladas y totales de Stat3 y Erk. (B) Misma aproximación experimental que en el apartado A pero las células se trataron con 10 ng/ml de TNFα y las proteínas fosforiladas y totales analizadas mediante Western blot fueron p65 y ERK.

## DISCUSIÓN

---



## 1. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la ruta del TGF $\beta$

### 1.1. La T3 inhibe la transcripción dependiente de Smads

En este trabajo hemos visto que la hormona tiroidea unida a los TRs puede atenuar las respuestas mediadas por el TGF $\beta$ . La actividad transcripcional del TGF $\beta$  está mediada principalmente por los factores de transcripción Smad (Shi y Massagué 2003) y, en las células que expresan TRs, la T3 es capaz de reprimir la activación por TGF $\beta$  de promotores que contiene elementos de unión para las Smads o SBEs. La T3 también inhibe la activación de promotores con SBEs tras la transfección de Smads, descartando que la hormona pudiera inhibir los efectos transcripcionales del TGF $\beta$  a través de la regulación de los niveles o actividad de los receptores para este factor. Esta observación, junto con el hecho de que la T3 inhiba la activación por TGF $\beta$  de una construcción quimérica Gal-Smad, indica que la T3 antagoniza directamente la transcripción mediada por los factores de transcripción Smad. Ese efecto antagónico ocurre independientemente del promotor y se observa en células de rata, ratón, visón y humanas. Por lo tanto, parece que la capacidad de la T3 de reprimir la actividad transcripcional de las Smads está bastante conservada entre los mamíferos.

Uno de los genes reprimidos por T3 es Smad7, que atenúa la transcripción dependiente de Smads, ya que está implicado en la retroalimentación negativa de la señalización por TGF $\beta$ . Su expresión se activa por este factor regulando así la actividad del TGF $\beta$  para mantener un equilibrio, evitando una acción excesiva del TGF $\beta$  (Itoh *et al* 1998, Massagué *et al* 2005, Nakao *et al* 1997a). Debido a esta retroalimentación negativa, la inhibición de la expresión de Smad7 podría contrarrestar el efecto supresor de la T3 sobre la señalización por TGF $\beta$ . Sin embargo, tanto los experimentos de transactivación como la medida de los transcritos estimulados por TGF $\beta$  muestran que el efecto inhibitorio de la T3 es predominante, ocurriendo incluso en presencia de una menor inducción de Smad7.

### 1.2. Los TRs interaccionan con las Smads

El antagonismo transcripcional entre los receptores nucleares y otros factores de transcripción en muchos casos implica interacciones proteína-proteína (Aranda y Pascual 2001). En este trabajo hemos demostrado que tanto las isoformas  $\alpha$  como  $\beta$  de los TRs se asocian con Smad3 y Smad4 y que el dominio de MH1 de la Smad3, que está conservado entre las R-Smads y

## DISCUSIÓN

la Co-Smad y contiene el motivo de unión a ADN (Massagué *et al* 2005), esta implicado en esta interacción. También hemos observado que la interacción con Smad2 es mucho menor que con Smad4 y Smad3. Una posible explicación para este comportamiento diferente podría residir en que el motivo de unión a ADN del dominio MH1 de la Smad2 tiene un inserto que le impide unirse al ADN (Massagué *et al* 2005). Es posible que esta estructura del MH1, en forma de horquilla  $\beta$ , que permite el contacto con el ADN, esté implicada en la interacción con el TR. Observamos, por otra parte, que la asociación entre el TR y las Smads se veía fuertemente reducida en presencia de T3 tanto en ensayos *in vitro* como en células tratadas con T3. Por lo tanto, podemos descartar un mecanismo por el que la hormona unida al TR pudiera promover la interacción del receptor con las Smads formando un complejo transcripcionalmente inactivo. Este es el mecanismo propuesto en el caso de la transrepresión mediada por el receptor nuclear huérfano COUP-TFII sobre la ruta del TGF $\beta$ , en el que el secuestro de la Smad4 a través de su interacción con el receptor sería responsable del antagonismo transcripcional (Qin *et al* 2013). En el caso de los TRs, parece mas bien que los receptores vacíos podrían aumentar la actividad o estabilidad del complejo transcripcional mediante la interacción con las Smads, otros factores de transcripción o corre reguladores, y que este efecto sería revertido en presencia de T3. Esto es lo que nos sugiere el hecho de que en ensayos de ChIP hayamos observado que los TRs vacíos están unidos a los SBE y son liberados por la T3 y de que en ausencia de ligando el receptor aumente la estimulación por TGF $\beta$  en ensayos de transfección transitoria. Se ha descrito algo similar con otro receptor nuclear, el receptor de ácido retinoico (RAR) en fibroblastos, donde se ha demostrado que el RAR $\gamma$  interacciona con la Smad3 y en presencia de un agonista del receptor esta unión disminuye, reduciéndose también la actividad transcripcional mediada por Smad (Pendaries *et al* 2003).

Sorprendentemente, en experimentos de coimmunoprecipitación hemos observado que la interacción entre el TR $\beta$  y la Smad4 es mayor en la fracción citoplasmática a pesar de que ambos son más abundantes en el núcleo. Aunque no tenemos una buena explicación para esta observación, hay que señalar que en consonancia con la idea de que los TRs y las Smads están sujetos a un intercambio entre el núcleo y el citoplasma (Nicolás *et al* 2004, Zhu *et al* 1998), detectamos que una fracción del TR $\beta$  transfectado tiene una localización citoplásmica, por lo que ambos factores de transcripción tendrían la posibilidad de formar un complejo en dicho compartimento celular.



### 1.3. Los dominios de los TRs implicados en la inhibición de la transcripción por TGF $\beta$ /Smad son diferentes a los requeridos para la transactivación dependiente de ligando

En ensayos de transfección transitoria hemos observado que mutantes de los TRs que no son capaces de reclutar coactivadores, ni por lo tanto de mediar la activación transcripcional dependiente de T3 (García-Silva *et al* 2011), aún muestran un significativo efecto antagónico sobre la actividad transcripcional de la vía TGF $\beta$ /Smad. Sin embargo, mutaciones en el DBD abolen la inhibición por T3, revelando que este dominio se requiere para la represión de la transcripción dependiente de TGF $\beta$ . El dominio de unión a ADN de los TRs es esencial para muchas funciones de los TRs *in vivo*, aunque otras pueden tener lugar en su ausencia (Shibusawa *et al* 2003). El hecho de que los receptores con las mutaciones C51G o C102G, que alteran la estructura del DBD, no muestren actividad represora podría ser consecuencia de su incapacidad para unirse al ADN. Sin embargo, existe otra posible explicación, ya que hemos visto que estas mutaciones causan también una fuerte disminución de la interacción con las Smads e inhiben la unión de los receptores a los promotores que contienen SBEs. Adicionalmente, el mutante GS120, que no puede unirse a los TREs, aunque si mantiene la interacción con el ligando y los cofactores (Shibusawa *et al* 2003), muestra también una menor interacción con las Smads y no antagoniza la transactivación por TGF $\beta$ , sugiriendo de nuevo que el DBD está implicado en la mediación del antagonismo independientemente de su capacidad para unirse a los TREs. Por lo tanto, podemos afirmar que la inhibición de la actividad transcripcional del TGF $\beta$  por las hormonas tiroideas implica dominios del TR diferentes a los responsables de la activación transcripcional clásica que requiere tanto la unión a TREs como el reclutamiento de coactivadores. Es más, el paralelismo entre la capacidad de los diferentes mutantes de los TRs para asociarse con las Smads, antagonizar su actividad transcripcional y unirse a los SBEs, sugiere que esta interacción sería funcionalmente importante para el antagonismo observado.

Un mutante del TR en la señal de localización nuclear que se encuentra cercana al DBD (Zhu *et al* 1998) tampoco es capaz de mediar la represión de la actividad transcripcional de TGF $\beta$ /Smad por la T3. Por lo tanto, el antagonismo dependiente de T3 parece requerir no sólo el dominio DBD del TR sino también una localización predominantemente nuclear del receptor, puesto que este mutante no es capaz de ejercer el efecto inhibitor que ejerce el receptor nativo. Sin embargo, el mutante aun mantiene un cierto efecto independiente de ligando. Esto podría indicar que el TR estabilizaría el complejo que se forma en el citoplasma entre las R-Smads y la Smad4. Por otra parte, la fosforilación de las Smads, que incrementa la translocación nuclear y la

## DISCUSIÓN

unión a ADN, también podría tener un papel en la estimulación mediada por los receptores vacíos, y de hecho, hemos encontrado niveles más altos de pSMAD3 en las células transfectadas con los receptores vacíos, sin tratamiento con T3. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el aumento de la actividad transcripcional mediado por los TRs vacíos se obtuvo en condiciones de sobreexpresión del receptor por lo que su significado funcional *in vivo* en las células que expresan niveles endógenos del receptor no es clara.

### **1.4. La T3 inhibe la fosforilación de las R-Smads, su asociación con los SBEs y la acetilación de histonas en los promotores diana del TGFβ**

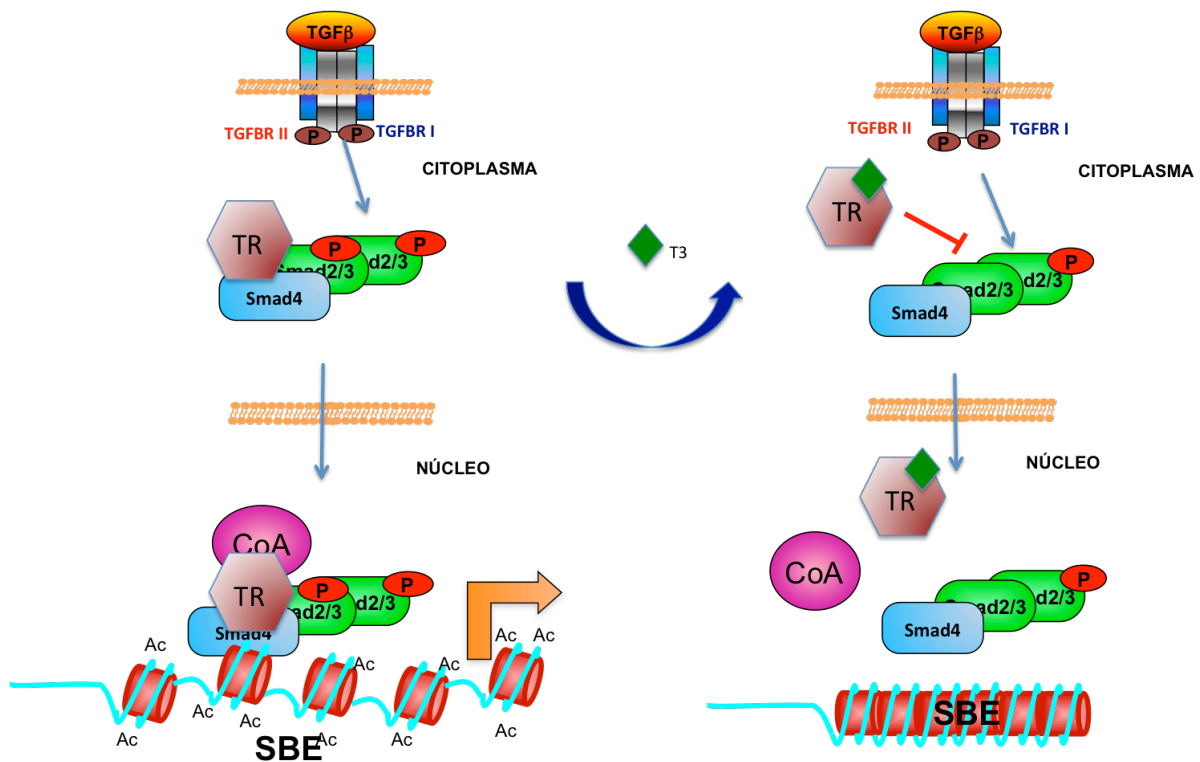
La unión de la T3 al TR podría reflejarse en un cambio conformacional que alterase la accesibilidad de las Smads a los complejos de fosforilación en respuesta a TGFβ. De hecho, observamos que la T3 reduce parcialmente la fosforilación de las R-Smads inducida por el factor de crecimiento. Esta inhibición no sólo ocurría con la Smad3 que interacciona directamente con el receptor, sino que también se detectaba en el caso de la Smad2, que como hemos demostrado presenta una interacción muy débil con los TRs. Por tanto, esta inhibición parece afectar a los complejos formados por las R-Smads. Ya que la fosforilación es requerida para la translocación nuclear de las Smads (Massagué 1998, Massagué *et al* 2005, Wrana *et al* 2000), también detectamos menores niveles de estos factores de transcripción en el núcleo en las células tratadas con T3.

Cabía la posibilidad de que la inhibición de la fosforilación de Smads por la T3 fuese debida a un aumento de la desfosforilación de estas proteínas en el núcleo por un aumento de los niveles o actividad de alguna fosfatasa, lo que se ha descrito que favorece su exportación nuclear (Lin *et al* 2006). Sin embargo descartamos la posibilidad de que las fosfatasas pudieran estar jugando un papel importante en la regulación de la señalización de TGFβ/Smads por la hormona, ya que la actividad transcripcional inducida por mutantes constitutivamente activos de Smad3 en la región SXS sigue siendo inhibida por la hormona.

Nuestros resultados sugerían que la T3 unida a los TRs podría suprimir la transducción de la señal por TGFβ/Smad reduciendo la asociación de los factores de transcripción Smads a los genes diana del TGFβ. Esto fue confirmado mediante ensayos de ChIP en los cuales la T3 reducía significativamente el reclutamiento de las Smads a los promotores diana inducido por el TGFβ. Puesto que la activación de la transcripción por Smads implica a su vez el reclutamiento de

coactivadores con actividad acetiltransferasa (Massagué 2012), como resultado de una menor fosforilación y translocación al núcleo de las Smads y de una menor eficiencia en la unión de las Smads a los SBEs en presencia de T3, la hormona inhibió la acetilación de histonas de los promotores diana del TGF $\beta$ .

El conjunto de nuestros resultados nos lleva a establecer un posible modelo del antagonismo transcripcional entre la ruta de señalización del TGF $\beta$ /Smads y el receptor de hormonas tiroideas en presencia o ausencia de T3, que queda reflejado en la figura 38.



**Figura 38. Posible modelo de la interacción entre la ruta del TGF $\beta$  y el TR unido, o no, al su ligando.** En ausencia de T3, el TR parece estar unido al complejo que se forma entre las R-Smads y la Co-Smad tras la inducción por TGF $\beta$ . El TR podría estar estabilizando el complejo y, en el núcleo, unirse también a las regiones que contienen SBEs de los promotores de los genes diana del TGF $\beta$ . En este estado se facilitaría el reclutamiento de coactivadores y la acetilación de las histonas, promoviendo así la transcripción. Sin embargo, la unión de la T3 al TR promovería la disociación de éste del complejo de Smads, disminuyendo la fosforilación de éstas. En el núcleo, disminuiría la unión de las Smads, y del TR, a los SBEs y con ello el reclutamiento de coactivadores, reduciéndose la acetilación de las histonas con la consecuente compactación de la cromatina y la resultante represión transcripcional.

### 2. Efecto de las hormonas tiroideas en modelos de fibrosis *in vivo*

#### 2.1. La administración de hormonas tiroideas atenúa el desarrollo de procesos fibróticos en el ratón *in vivo*

Como se ha mencionado, el TGF $\beta$  juega un papel fundamental en el desarrollo de los procesos fibróticos (Border y Noble 1994, Leask 2004). En la patología de la fibrosis, el daño tisular inducido por el TGF $\beta$  tiene como resultado una respuesta excesiva de reparación de heridas, caracterizada por la síntesis de grandes cantidades de matriz extracelular, promoviendo la diferenciación de los fibroblastos, o las células hepáticas estrelladas en el caso del hígado, en miofibroblastos (Rosenbloom *et al* 2010). La activación de los fibroblastos por TGF $\beta$  induce la expresión de genes profibróticos a través de la vía canónica de las Smads, uniéndose a los SBEs y remodelando la cromatina mediante la acetilación de histonas (Leask 2004, Meng *et al* 2016). Como habíamos visto que las hormonas tiroideas inhibían las respuestas transcripcionales de la vía TGF $\beta$ /Smad, nuestra hipótesis fue que la administración de hormonas tiroideas podría inhibir el desarrollo de la fibrosis *in vivo*. Para ello utilizamos dos modelos experimentales diferentes en ratón: la administración i.p. de CCl<sub>4</sub>, uno de los métodos más utilizados para generar fibrosis hepática (Pérez Tamayo 1983, Pierce *et al* 1987) y la inyección subcutánea de bleomicina, que causa esclerodermia y fibrosis cutánea (Lakos *et al* 2004, Yamamoto *et al* 1999). En ambos modelos, al menos en las primeras etapas del tratamiento, se produce una activación de la vía del TGF $\beta$  y la importancia de las Smads en la respuesta fibrótica se pone de manifiesto por el hecho de que los ratones knockout para la Smad3 presentan resistencia a la fibrosis pulmonar y cutánea inducida por bleomicina (Lakos *et al* 2004, Zhao *et al* 2002) y a la deposición de colágeno en la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (Schnabl *et al* 2001).

Nuestros resultados demostraron que la activación de la señalización por los TRs atenúa el desarrollo de la fibrosis hepática y cutánea inducidas químicamente, ya que, tanto la deposición de colágeno como la expresión del principal marcador de miofibroblastos, el  $\alpha$ -SMA (Brenner 2009), se redujeron significativamente en los ratones que habían sido tratados con hormonas tiroideas. En el caso de la fibrosis hepática, esta reducción se puso claramente de manifiesto por el menor índice de Ishak y el disminuido daño hepático, y en el caso de la fibrosis cutánea, por la falta de un aumento significativo del tejido conectivo que no llega a invadir la hipodermis, mientras que ésta prácticamente desaparece en los animales control tratados con bleomicina. En ambos modelos, el hipertiroidismo disminuye de forma muy marcada la inducción de la expresión de genes profibróticos y del propio gen de  $\alpha$ -Sma por los agentes fibróticos, lo que podría concordar con una menor activación de la vía de TGF $\beta$ /Smad. En efecto, pudimos comprobar que,

de acuerdo con los datos obtenidos en las células en cultivo tratadas con T3, las hormonas tiroideas disminuyeron la activación de las Smads tanto en el hígado como en la piel, disminuyendo su fosforilación. Aunque ambas, Smad2 y Smad3, son activadas en la fibrosis hepática (Fabregat *et al* 2016, Inagaki y Okazaki 2007), se ha descrito recientemente que sólo Smad3 es clave en la transducción de la señal responsable del desarrollo de la fibrosis, teniendo incluso la Smad2 un efecto protector, ya que podría inhibir la fosforilación de Smad3 por competición (Zhang *et al* 2015). Sin embargo este fenómeno no parece interferir en el efecto de las hormonas tiroideas, ya que la inhibición de la fosforilación de ambas Smads es similar.

## **2.2. La T3 inhibe la activación de los fibroblastos por TGFβ**

Para definir si los fibroblastos podrían ser una diana directa de las hormonas tiroideas en la inhibición de las respuestas fibróticas, también analizamos las respuestas transcripcionales y la fosforilación de Smads en cultivos primarios de fibroblastos tratados con TGFβ y/o T3. Pudimos observar que dichas respuestas también se inhibían en presencia de T3, sugiriendo que las hormonas tiroideas podrían actuar directamente en los fibroblastos y quizás también sobre las células estrelladas inhibiendo su diferenciación a miofibroblastos. Esta hipótesis se refuerza por el hallazgo de que la T3 inhibe la inducción del gen de  $\alpha$ -Sma por TGFβ en los cultivos, en concordancia con su menor estimulación *in vivo* en los animales hipertiroides. Asimismo, tanto la inducción del gen del Colágeno1a1 como del propio TGFβ1 es menor en las células tratadas con T3. Disminuyendo la accesibilidad de las Smads a los SBEs, los TRs unidos a la hormona podrían pues antagonizar directamente la producción de TGFβ, la activación de los miofibroblastos y la expresión de los genes profibróticos, contribuyendo así a la inhibición del desarrollo de la fibrosis *in vivo*. Este antagonismo transcripcional entre los TRs y las Smads representa un mecanismo que no había sido descrito previamente en la regulación de los procesos fibróticos.

## **2.3. Los ratones que carecen de receptores de hormonas tiroideas desarrollan espontáneamente fibrosis hepática**

Ya que la administración de hormonas tiroideas reduce la fibrosis hepática, nos planteamos la posibilidad de que la falta de señalización por la hormona pudiese tener el efecto contrario, aumentando la fibrosis en este tejido. Para analizar esta hipótesis utilizamos ratones en los que se han inactivado los genes TRα1 y TRβ. Estos animales carecen de las principales

isoformas de receptor que unen las hormonas tiroideas y por tanto presentan una resistencia extrema a la acción de dichas hormonas (Göthe *et al* 1999). Pudimos observar que, en ausencia de tratamiento, en estos animales con el tiempo aparece una deposición espontánea de colágeno en el hígado, con un patrón característico de una cirrosis incipiente. Esto no se observó nunca en animales normales de la misma edad, que presentaban además una menor fosforilación de Smad y una menor expresión de los genes de *TGFβ1* y *Colágeno1α1*. Estos hallazgos implican que los receptores endógenos actuarían como reguladores negativos de la respuesta fibrótica *in vivo* en este órgano. Por otra parte, también indican que la inhibición dependiente de T3 de la vía TGFβ/Smad es el efecto predominante *in vivo*, ya que si el efecto estimulador de los receptores vacíos sobre dicha vía fuese el efecto relevante no se hubiera detectado un aumento de la fibrosis en los ratones que carecen de dichos receptores.

### **2.4. Posibles efectos terapéuticos de ligandos de receptores nucleares en los procesos fibróticos**

Estudios previos han mostrado que tanto la deficiencia como el exceso de hormonas tiroideas pueden inhibir la fibrosis. Así, hay trabajos en los que se propone que el hipotiroidismo inducido por drogas antitiroideas pueden prevenir la fibrosis cutánea y pulmonar inducida por ácido hipocloroso (Bagnato *et al* 2013) y mejorar la supervivencia tras una administración aguda de tioacetamida en ratas (Bruck *et al* 1998). Sin embargo, el hipotiroidismo puede también inducir fibrosis cardíaca en ratas (Ghose Roy *et al* 2007, Zhang *et al* 2013), la administración de hormonas tiroideas mejora la fibrosis renal (Lin y Sun 2011), y la disfunción tiroidea y el hipotiroidismo subclínico se han asociado con la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y la enfermedad del hígado graso no alcohólico en humanos (Chung *et al* 2012, Perra *et al* 2008). Estas observaciones revelan el complejo papel de las hormonas tiroideas en la fibrosis y que éste podría depender del tipo de daño o tejido examinado. En el caso del hígado, y de acuerdo con nuestros resultados, un análogo selectivo de TRβ fue efectivo disminuyendo la enfermedad hepática y carcinogénesis en roedores (Chung *et al* 2012, Perra *et al* 2009, Silveira *et al* 2009).

Aunque la hormona natural y los agonistas de los TRs desarrollados hasta el momento presentan numerosos efectos adversos (Aranda *et al* 2013, Mullur *et al* 2014), existe la posibilidad de que se puedan generar nuevos agentes tiromiméticos con menos efectos secundarios que podrían ser usados para bloquear la progresión de las enfermedades fibróticas. Se podría también, por otra parte, aprovechar el hecho de que mutantes de los TRs que no son capaces de

reclutar coactivadores ni de mediar la activación transcripcional dependiente de T3 son capaces de mediar la represión. Esto permitiría el desarrollo de lo que se denominan ligandos “disociados” que pudieran conservar el efecto antagonista de la vía TGF $\beta$ /Smad sin estimular la transcripción. De este modo se evitarían muchos de los efectos adversos propios de un exceso de señalización por hormona tiroidea.

Recientemente, se ha descrito que ligandos de otros receptores nucleares pueden también reprimir la fibrosis. Concretamente, se han descrito efectos antifibróticos y de inhibición de la ruta del TGF $\beta$  por parte de otros receptores nucleares como el receptor X de pregnanos (PXR) inhibiendo la fibrosis dérmica inducida por bleomicina (Beyer *et al* 2013), o el receptor X de farnesoides (FXR), cuyo agonista protege frente al daño colestásico y reduce la expresión de TGF $\beta$ 1 inducida por la ligación del conducto biliar (Liu *et al* 2003). Por otra parte, la señalización mediada por el receptor de vitamina D previene la fibrosis hepática inducida por CCl4, ya que, en presencia de ligando, los VDRs se unen a los genes co-regulados por este receptor y las Smads, reduciendo la accesibilidad de la Smad3 y su actividad transcripcional (Ding *et al* 2013). Mas aún, se ha demostrado que un agonista del receptor de la vitamina D sin efectos hipercalcémicos muestra un efecto antifibrótico (Ito *et al* 2013). Esto sirve como prueba de concepto de que el desarrollo de ligandos de receptores nucleares que no estimulan la transcripción pero que son capaces de interrumpir la actividad del TGF $\beta$ /Smad, podrían constituir un nuevo enfoque farmacológico para tratar enfermedades humanas.

### 3. Efecto de las hormonas tiroideas en la inflamación hepática

#### 3.1. La administración de hormonas tiroideas disminuye la activación de Stat3 y Erk por CCl4 en las etapas iniciales de la fibrosis

Aunque nuestros resultados revelan que el antagonismo transcripcional de la vía TGF $\beta$ /Smad por la hormona tiroidea unida a sus receptores juega un papel crucial en la inhibición de la fibrosis, no podemos excluir la posibilidad de que los TRs pudiesen ejercer otros efectos supresores sobre la fibrogénesis. Por ejemplo, la inflamación parece jugar un papel importante en las etapas iniciales de esta patología, sensibilizando a las células a la activación por TGF $\beta$ /Smads (Pellicoro *et al* 2014, Seki *et al* 2007). Es bien conocido que ligandos de diferentes receptores nucleares presentan potentes efectos anti-inflamatorios (Glass y Ogawa 2006, Glass y Saijo 2010, Ogawa *et al* 2005, Pascual *et al* 2006) y previamente en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la depleción de los TRs aumenta la respuesta inflamatoria en la piel (Contreras-Jurado *et al*

2011). Por ello, en la última parte de esta tesis nos propusimos analizar los principales marcadores inflamatorios en el modelo de fibrosis hepática estudiado. Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Stat3, así como la quinasa Erk son los efectores más importantes de la activación de las rutas de citoquinas como la IL-6 y del TNF $\alpha$ , los principales mediadores inflamatorios (He y Karin 2011, Pålsson-McDermott y O'Neill 2004, Zhou *et al* 2015). Por tanto, analizamos su actividad en el hígado de los animales controles y tratados con hormonas tiroideas, observando un aumento de la fosforilación de Stat3 y Erk, que son estimulados principalmente por IL-6, en los hígados de los ratones eutiroideos sometidos a un tratamiento agudo con CCl<sub>4</sub>, mientras que en los hipertiroideos no se observó este aumento o incluso se vio ligeramente disminuido en el caso de Erk. Sin embargo, no se apreció ninguna activación del principal efector del TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B. Tampoco se observaron cambios en los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> de forma crónica, lo que se podría explicar por la fase más avanzada de la enfermedad, ya que parece que la inflamación juega un papel más importante en etapas incipientes de la fibrosis, puesto que precede al inicio de la misma (Pellicoro *et al* 2014). Estos datos sugieren que las hormonas tiroideas, al menos al inicio de la patología, también podrían inhibir el progreso de fibrosis hepática mediante la supresión, en parte, del proceso inflamatorio.

Por otra parte, el estudio de estas rutas en los ratones de edad avanzada que no expresan TRs y desarrollan fibrosis espontáneamente, mostró un aumento significativo de la fosforilación de Stat3 y de Erk, mientras que en el caso de p65 el aumento fue modesto. Este incremento, así como la deposición de colágeno se observó en animales de ambos sexos, que se estudiaron ya que la producción de IL-6 presenta un acusado dimorfismo sexual (Everhardt Queen *et al* 2016, Naugler *et al* 2007). Estos resultados concuerdan con la inhibición observada cuando existe un exceso de señalización por hormonas tiroideas, sugiriendo que los TRs podrían jugar un papel como reguladores negativos de la respuesta fibrótica, así como de estas rutas de señalización propias de la respuesta inmunitaria que también influye en el desarrollo de la fibrosis.

### **3.2. Las hormonas tiroideas no inhiben la producción hepática de citoquinas**

En vista de estos resultados, nuestra primera hipótesis fue que los TRs podrían ejercer un papel represor sobre la producción de citoquinas, que son cruciales para el reclutamiento de células inflamatorias. Sin embargo, sorprendentemente, los niveles de IL-6 y TNF $\alpha$ , los principales mediadores de la activación de Stat3 y NF- $\kappa$ B, no eran mayores en los ratones deficientes de TRs y se encontraban incluso aumentados en los ratones hipertiroideos tratados con CCl<sub>4</sub> de forma



aguda, cuando la activación de Stat3 en estos ratones era menor. Por ello, podemos descartar que los TRs tengan un efecto sobre la producción de las citoquinas, sino que más bien actúan sobre sus efectores. Curiosamente, en estudios previos en el laboratorio, se ha visto un incremento en la expresión de citoquinas en la piel ratones deficientes de TRs en respuesta al tratamiento con 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) (Contreras-Jurado *et al* 2011). Por lo tanto, el efecto de los TRs sobre la producción de citoquinas y las respuestas inflamatorias parece ser un fenómeno complejo que puede diferir en función del tipo de tejido y del estímulo inflamatorio.

Para estudiar con mayor profundidad el papel de los TRs y las hormonas tiroideas en los procesos de inflamación hepática, en otro trabajo que hemos realizado recientemente, hemos usado también ratones deficientes de TR y ratones hipertiroides pero en este caso sometidos a tratamiento con lipopolisacárido LPS, el principal componente de la membrana de las bacterias Gram-negativas y causante del shock endotóxico, la forma más letal de sepsis (Akira *et al* 2006, Beutler y Rietschel 2003). Se obtuvieron resultados paralelos a los observados con CCl<sub>4</sub>, aunque con una respuesta inmune mayor, como era de esperar, debido al potencial inflamatorio del LPS. Se observó de nuevo una menor fosforilación hepática de Stat3 y Erk en los ratones hipertiroides y una mayor activación en los animales deficientes de TRs, aunque los niveles de citoquinas cursaban de forma opuesta (Contreras-Jurado *et al* 2016). Esta disonancia entre los niveles de citoquinas hepáticos y la respuesta a las mismas puede venir dada por algún mecanismo de retroalimentación negativa o porque el exceso de hormona sea compensado de alguna forma con la mayor producción de citoquinas. De acuerdo con esta idea, se ha observado que la producción de hormonas tiroideas se reduce tras el tratamiento con LPS en ratones (Boelen *et al* 2004), que sirve como modelo para el síndrome de enfermedad no tiroidea o síndrome de enfermo eutiroideo (SEE) en los humanos (de Vries *et al* 2015). En estas condiciones, la IL-6 parece también estar implicada ya que en animales deficientes de IL-6 la caída en los niveles circulantes de hormona tiroidea es menor (Boelen *et al* 1996). La inhibición de la secreción de hormonas tiroideas (Boelen *et al* 2004), así como la expresión reducida de TR y su compañero de heterodimerización, RXR (Beigneux *et al* 2003, Beigneux *et al* 2000) podrían contribuir a limitar los efectos perjudiciales del exceso de señalización de hormona tiroidea durante la sepsis inducida por LPS, ya que hemos visto que en condiciones de hipertiroidismo aumenta la mortalidad de los ratones tratados con LPS (Contreras-Jurado *et al* 2016).

### 3.3. La T3 inhibe la señalización y transcripción génica mediadas por IL-6

Los efectos disociados de las hormonas tiroideas sobre los niveles de citoquinas y la activación de sus rutas de señalización sugerían que estas hormonas podrían actuar directamente en las células hepáticas reprimiendo la señalización por citoquinas. Hemos demostrado que las hormonas tiroideas pueden interferir directamente con estas rutas en células Hep3B en cultivo. La T3 suprime la señalización de IL-6 inhibiendo la activación de las dos principales dianas de la citoquina: STAT3 y ERK. Este efecto no se debe a una expresión reducida de los receptores de IL-6, por lo que los TRs parecen inhibir la activación de STAT3 en una etapa posterior a la unión de la citoquina a sus receptores. Adicionalmente, la activación de Stat3 en respuesta a la incubación con IL-6 se vio suprimida por la T3 también en macrófagos, indicando que la inhibición de la señalización de IL-6 por las hormonas tiroideas también ocurre en estas células que ejercen funciones reguladoras clave durante la inflamación.

Se sabe que entre los genes diana de la IL-6 en el hígado se encuentran los genes de las APPs (Alonzi *et al* 2001). Estos forman parte de la inmunidad innata y tienen una importante función en la respuesta que se produce frente al daño tisular, la infección o la inflamación (Gabay y Kushner 1999, Heinrich *et al* 1990, Medzhitov 2007). Ya que la T3 atenúa la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6, estudiamos su efecto sobre la expresión de estos genes, demostrando que la hormona también antagoniza la inducción de los genes de las APPs en respuesta a la citoquina. Puesto que la fosforilación de STAT3 induce su translocación al núcleo y permite su unión a sus elementos de respuesta en los genes diana (Bode *et al* 2012, Ehret *et al* 2001), la inhibición de la fosforilación de STAT3 por la T3 se tradujo en una disminución de la asociación del factor de transcripción a sus regiones reguladoras. La estimulación de la transcripción por los factores STAT implica el reclutamiento de coactivadores con actividad acetiltransferasa (Paulson *et al* 1999), por lo que en concordancia con los efectos inhibitorios de la T3 que habíamos visto, ésta disminuyó la abundancia de la histona 4 acetilada, una marca de activación transcripcional. Algunos de los genes examinados como *SAA1* o incluso *SOCS3*, que contienen elementos de respuesta a STAT y son ampliamente conocidos como dianas de la IL-6, no respondían a esta citoquina en las células Hep3B estudiadas, indicando la importancia del contexto celular y las limitaciones de los modelos de cultivos celulares. De cualquier modo, nuestros resultados sugieren que las hormonas tiroideas pueden contrarrestar la respuesta de las células del hígado al exceso de citoquinas producido en condiciones de hipertiroidismo *in vivo*, reduciendo sus acciones transcripcionales y sirviendo como un mecanismo de defensa mediante retroalimentación negativa.

Los cambios encontrados en la fosforilación de p65 tanto en los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> como los deficientes de TRs, no han sido destacables. Sin embargo, hemos observado recientemente que la inducción de la fosforilación hepática de p65 es menor en los ratones hipertiroideos y mayor en los *KO* para los TRs tras el tratamiento con LPS (Contreras-Jurado *et al* 2016). Estos cambios sugieren que las hormonas podrían también antagonizar la activación de NF- $\kappa$ B que juega un papel crucial en la respuesta a citoquinas proinflamatorias. Previamente en el laboratorio, también se había visto que la T3 disminuye la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  en el cultivo sin suero de células tumorales hipofisarias de rata, provocando una disminución significativa de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B (Chiloeches *et al* 2008, Lasa *et al* 2010). Sin embargo, en las células Hep3B o en macrófagos, la T3 no reduce la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$ . En las células hipofisarias, esta inhibición implica una inducción de la fosfatasa de las MAPK, la fosfatasa de especificidad dual 1 (DUSP1) (Chiloeches *et al* 2008). Es posible que este mecanismo no se de en los otros tipos celulares. Por ello, se necesitan más estudios para clarificar el posible antagonismo de los TRs en la activación de NF- $\kappa$ B observada *in vivo* en el hígado.

El hígado es un órgano central en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y en el control de las respuestas inflamatorias durante la infección. Las ya conocidas funciones de los TRs en el hígado se han ido expandiendo desde su papel en la regulación del metabolismo del hígado (Sinha *et al* 2014), a la participación en su regeneración (López-Fontal *et al* 2010), senescencia (Zambrano *et al* 2014), hepatocarcinogénesis (Frau *et al* 2015) o fibrosis como hemos mostrado en esta tesis. En esta última parte del trabajo se demuestra que estos receptores son además reguladores importantes de la respuesta inflamatoria, existiendo una conexión entre la señalización de las hormonas tiroideas y la activación de Stat3 y Erk. Por lo tanto, los TRs podrían representar un punto de confluencia entre las respuestas metabólicas e inflamatorias en el hígado, sugiriendo de nuevo que podrían ser dianas importantes para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades hepáticas. Cabe resaltar de nuevo que sería importante el descubrimiento de nuevos ligandos que pudieran disociar sus efectos beneficiosos en las enfermedades hepáticas de sus efectos potencialmente peligrosos ya que las hormonas tiroideas nativas aumentan la mortalidad durante la sepsis.

## CONCLUSIONES

---

1. Ambas isoformas del receptor de hormonas tiroideas, TR $\alpha$  y TR $\beta$ , antagonizan la transcripción activada por TGF $\beta$  de manera dependiente de ligando, reduciendo la actividad transcripcional de las SMADs.
2. El dominio de unión a ADN (DBD) del TR esta implicado en la represión por T3 de la transcripción inducida por TGF $\beta$ . Sin embargo, la interacción con coactivadores parece ser prescindible.
3. Existe una interacción directa entre el receptor de hormonas tiroideas y las Smad3 y 4, en la que el dominio de unión a ADN juega un papel importante. Esta interacción se reduce en presencia de T3.
4. El receptor de hormonas tiroideas esta unido a las regiones que contienen elementos de unión a Smad (SBE) de los genes diana del TGF $\beta$ . La T3 disminuye esta unión. La hormona también reduce el reclutamiento de Smad2/3 y Smad4 así como la acetilación de la histona 4 inducida por TGF $\beta$ .
5. El receptor de hormonas tiroideas requiere una localización fundamentalmente nuclear para ejercer su efecto antagónico sobre la activación mediada por TGF $\beta$ , pero no está implicado en la desforilación nuclear de las Smads que conduce a su exportación.
6. La administración de hormonas tiroideas disminuye la fosforilación de Smad2 y 3 y la necrosis de los hepatocitos que rodean las venas centrolobulillares inducida por el tratamiento agudo con CCl4 en ratones.
7. El hipertiroidismo disminuye el desarrollo de la fibrosis hepática y cutánea inducidas por la administración crónica de CCl4 y bleomicina, respectivamente, en ratones.
8. Los ratones viejos deficientes de TRs muestran un aumento de la fosforilación de Smad y una deposición espontánea de colágeno en el hígado.
9. Estos ratones también muestran una mayor fosforilación de Stat3, p65 y Erk, sin presentar cambios en la expresión de los mediadores inflamatorios que activan estas rutas como IL-6 o TNF $\alpha$ .
10. La T3 reduce la activación transcripcional mediada por IL-6 en células de hepatocarcinoma y en macrófagos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Akashi K, Saegusa J, Sendo S, Nishimura K, Okano T, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N and Morinobu A (2016) Knockout of endothelin type B receptor signaling attenuates bleomycin-induced skin sclerosis in mice. *Arthritis Research & Therapy*. *Arthritis Research & Therapy* 18(1): 113.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4): 783–801.
- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Libert C, Poli V and Rizzuto G (2001) Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as Revealed by Inducible Gene Activation in the Liver Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as Revealed by Inducible Gene Activation in the Liver. *Molecular and cellular biology* 21(5): 1621–1632.
- Aranda A, Alonso-Merino E and Zambrano A (2013) Receptors of thyroid hormones. *Pediatric endocrinology reviews : PER*, 2–13.
- Aranda A and Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* 81(3): 1269–304.
- Arthur MJP (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol AJP -Gastrointestinal and Liver Physiology* 279: 245–249.
- Attisano L and Wrana JL (1996) Signal transduction by members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Elsevier 7(4): 327–339.
- Attisano L, Wrana JL, López-Casillas F and Massagué J (1994) TGF- $\beta$  receptors and actions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier 1222(1): 71–80.
- Babon JJ, Varghese LN and Nicola NA (2014) Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Seminars in Immunology* 26(1): 13–19.
- Bagnato G, Bitto A, Irrera N, Pizzino G, Sangari D, Cinquegrani M, Roberts W, Atteritano M, Altavilla D, Squadrito F, Bagnato G and Saitta A (2013) Propylthiouracil prevents cutaneous and pulmonary fibrosis in the reactive oxygen species murine model of systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*. BioMed Central 15(5): R120.
- Bataller R and Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115(2): 209–18.
- Beato M, Henrillch P and Schutz G (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857
- Beigneux AP, Moser A, Shigenaga J, Grunfeld C and Feingold K (2003) Sick euthyroid syndrome is associated with decreased TR expression and DNA binding in mouse liver. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284(1): E228-36.
- Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C and Feingold KR (2000) The Acute Phase Response is Associated with Retinoid X Receptor Repression in Rodent Liver. *J. Biol. Chem.* 275(21): 16390–16399.

## BIBLIOGRAFÍA

Belandia B, Latasa MJ, Villa A and Pascual A (1998) Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 273(46): 30366–30371.

Bernal J and Refetoff S (1977) The action of thyroid hormone. *Clinical Endocrinology* 6(1 977): 227–249.

Beutler B and Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews. Immunology* 3(2): 169–76.

Beyer C, Skapenko A, Distler A, Dees C, Reichert H, Munoz L, Leipe J, Schulze-Koops H, Distler O, Schett G and Distler JHW (2013) Activation of pregnane X receptor inhibits experimental dermal fibrosis. *Annals of the rheumatic diseases* 72(4): 621–5.

Bigler J and Eisenman RN (1995) Novel location and function of a thyroid hormone response element. *The EMBO journal* 14(22): 5710–23.

Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC and Schaper F (2012) Hepatic acute phase proteins -Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH. 91(6–7): 496–505.

Bodenner DL, Mroczynski MA, Weintraub BD, Radovick S and Wondisford FE (1991) A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *The Journal of biological chemistry* 266(32): 21666–73.

Boelen A, Kwakkel J, Thijssen-Timmer DC, Alkemade A, Fliers E and Wiersinga WM (2004) Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in lipopolysaccharide-induced acute illness in mice. *Journal of Endocrinology* 182(2): 315–323.

Boelen A, Maas MA, Lowik CW, Platvoet MC and Wiersinga WM (1996) Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knock-out mice: a causal role of IL-6 in the development of the low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome. *Endocrinology* 137(12):5250-4.

Border WA and Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine* 331(19): 1286–92.

Bosscher K De, Berghe W Vanden and Haegeman G (2003) The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor-κB or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. *Endocrine Reviews*. Endocrine Society 24: 488–522.

Brenner DA (2009) Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120: 361–368.

Bruck R, Oren R, Shirin H, Aeed H, Papa M, Matas Z, Zaidel L, Avni Y and Halpern Z (1998) Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 27(4): 1013–1020.

Chan IH and Privalsky ML (2009) Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors α1 and β1. *Molecular endocrinology* 23(11):



1758–75.

Chen-Park FE, Huang D Bin, Noro B, Thanos D and Ghosh G (2002) The  $\kappa$ B DNA sequence from the HIV long terminal repeat functions as an allosteric regulator of HIV transcription. *Journal of Biological Chemistry* 277(27): 24701–24708.

Chen FE, Huang DB, Chen YQ and Ghosh G (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 391(6665): 410–3.

Chen L-F and Greene WC (2003) Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *Journal of molecular medicine* 81(9): 549–57.

Chen L-F and Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(5): 392–401.

Chen L-F, Mu Y and Greene WC (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- $\kappa$ B. *EMBO Journal* 21(23): 6539–6548.

Chen L-F, Fischle W, Verdin E, Greene WC, Baldwin AS, Ghosh S, May MJ, Kopp EB, Karin M, Perkins ND, Hottiger MO, Felzien LK, Nabel GJ, Sheppard KA, Zhong H, Voll RE, Ghosh S, Imhof A, Wolffe AP, Sterner DE, Berger SL, Kouzarides MT, Kuo H, Allis CD, Cress WD, Seto E, Ng HH, Bird A, Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC, Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U, Beg AA, Finco TS, Nantermet P V., Baldwin AS, Arenzana-Seisdedos F, Arenzana-Seisdedos F, Bogerd H, Greene WC, Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I, Spilianakis C, Papamatheakis J, Kretsovali A, Yoshida M and Horinouchi S (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science. American Association for the Advancement of Science* 293(5535): 1653–7.

Cheng SY, Leonard JL and Davis PJ (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews* 31(2): 139–170.

Chiloeches A, Sánchez-Pacheco A, Gil-Araujo B, Aranda A and Lasa M (2008) Thyroid Hormone-mediated Activation of the ERK/Dual Specificity Phosphatase 1 Pathway Augments the Apoptosis of GH4C1 Cells by Down-Regulating Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity. *Molecular endocrinology* 22: 2466–2480.

Chung GE et al (2012) Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. *Journal of Hepatology. Elsevier* 57(1): 150–156.

Chung GE, Kim D, Kim W, Yim JY, Park MJ, Kim YJ, Yoon JH and Lee HS (2012) Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. *Journal of hepatology* 57(1): 150–6.

Clouthier DE, Comerford S a and Hammer RE (1997) Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 100(11): 2697–713.

Contreras-Jurado C, Alonso-Merino E, Saiz-Ladera C, Valiño AJ, Regadera J, Alemany S and Aranda A (2016) The Thyroid Hormone Receptors Inhibit Hepatic Interleukin-6 Signaling During Endotoxemia. *Scientific reports* 3 6): 30990.

## BIBLIOGRAFÍA

- Contreras-Jurado C, García-Serrano L, Gómez-Ferrería M, Costa C, Paramio JM and Aranda A (2011) The thyroid hormone receptors as modulators of skin proliferation and inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 286(27): 24079–24088.
- Cook CB, Kakucska I, Lechan RM and Koenig RJ (1992) Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* 130(2): 1077–9.
- Costamagna E, García B and Santisteban P (2004) The Functional Interaction between the Paired Domain Transcription Factor Pax8 and Smad3 Is Involved in Transforming Growth Factor- $\beta$  Repression of the Sodium/Iodide Symporter Gene. *Journal of Biological Chemistry* 279(5): 3439–3446.
- Denissova NG, Pouponnot C, Long J, He D and Liu F (2000) Transforming growth factor beta - inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12): 6397–6402.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB and Goeddel DV (1985) Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316(6030): 701–5.
- Dewidar B, Soukupova J, Fabregat I and Dooley S (2015) TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis: Updated. *Current Pathobiology Reports*. 3(4): 291–305.
- Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M, Coulter S, He M, Scott C, Lau SL, Atkins AR, Barish GD, Gunton JE, Liddle C, Downes M and Evans RM (2013) A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell* 153(3): 601–13.
- Dissmeyer N and Schnittger A (2011) Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. *Methods in molecular biology* 779: 93–138.
- Don-Doncow N, Escobar Z, Johansson M, Kjellström S, Garcia V, Munoz E, Sterner O, Bjartell A and Hellsten R (2014) Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 289(23): 15969–15978.
- Dumitrescu AM, Liao X-H, Abdullah MSY, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE and Refetoff S (2005) Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nature genetics* 37(11): 1247–1252.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T and Miyazono K (2001) Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 276(16): 12477–12480.
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M and Bucher P (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins: Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *Journal of Biological Chemistry* 276(9): 6675–6688.
- Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, Müller PJ, Mütze B, Wolf A and Schaper F (2012) Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *European Journal of Cell Biology*. 91(6–7): 486–495.

- Everhardt Queen A, Moerdyk-Schauwecker M, McKee LM, Leamy LJ and Huet YM (2016) Differential Expression of Inflammatory Cytokines and Stress Genes in Male and Female Mice in Response to a Lipopolysaccharide Challenge. *Plos One* 11(4): e0152289.
- Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G and ten Dijke P (2016) TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS Journal* 283: 2219–2232.
- Feng XH and Derynck R (2005) Specificity and Versatility in TGF- $\beta$  Signaling Through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21(1): 659–693.
- Feng XH, Lin X and Derynck R (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *The EMBO journal* 19(19): 5178–93.
- Flamant RIC, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TOMS and Vennström B (2006) International Union of Pharmacology. LIX. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Thyroid Hormone Receptors. *Molecular Biology* 58(4): 705–711.
- Flanders KC and Burmester JK (2003) Medical applications of transforming growth factor-beta. *Clinical medicine & research* 1(1): 13–20.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB and Roberts AB (2002) Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *The American journal of pathology*. 160(3): 1057–68.
- Forman BM and Samuels HH (1990) Dimerization among nuclear hormone receptors. *The New biologist* 2(7): 587–94.
- Forrest D and Vennström B (2000) Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 10(1): 41–52.
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedingier M, Malaval L, Rousset B and Samarut J (1997) The T3R $\alpha$  gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO Journal* 16(14): 4412–4420.
- Frau C, Loi R, Petrelli A, Perra A, Menegon S, Kowalik MA, Pinna S, Leoni VP, Fornari F, Gramantieri L, Ledda-Columbano GM, Giordano S and Columbano A (2015) Local hypothyroidism favors the progression of preneoplastic lesions to hepatocellular carcinoma in rats. *Hepatology* 61(1): 249–259.
- Friedman SL (2003) Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 38: 38–53.
- Gabay C and Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine* 340(6): 448–54.
- Gäbele E, Brenner DA and Rippe RA (2003) Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8: d69-77.
- Garbers C, Aparicio-Siegmund S and Rose-John S (2015) The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: Recent advances towards specific inhibition. *Current Opinion in Immunology* 34: 75–82.

## BIBLIOGRAFÍA

García-Serrano L, Gomez-Ferrería MA, Contreras-Jurado C, Segrelles C, Paramio JM and Aranda A (2011) The thyroid hormone receptors modulate the skin response to retinoids. *PLoS ONE* 6(8).

García-Silva S, Martínez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L and Aranda A (2011) Thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 domains responsible for the antagonism with the ras oncogene: role of corepressors. *Oncogene* 30(7): 854–64.

Gentry LE, Webb NR, Lim GJ, Brunner AM, Ranchalis JE, Twardzik DR, Lioubin MN, Marquardt H and Purchio AF (1987) Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Molecular and cellular biology* 7(10): 3418–27.

Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeigler A and Bianco AC (2008) Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine Reviews* 29(7): 898–938.

Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W and Banerjee A (2006) Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25(51): 6781–99.

von Gersdorff G, Susztak K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D and Böttinger EP (2000) Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor  $\beta$  *Journal of Biological Chemistry* 275(15): 11320–11326.

Ghose Roy S, Mishra S, Ghosh G and Bandyopadhyay A (2007) Thyroid hormone induces myocardial matrix degradation by activating matrix metalloproteinase-1. *Matrix Biology* 26(4): 269–279.

Ghosh S, May MJ and Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16: 225–60.

Glass CK and Ogawa S (2006) Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology* 6(1): 44–55.

Glass CK and Saijo K (2010) Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature reviews. Immunology* 10(5): 365–376.

Göthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennström B and Forrest D (1999) Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary – thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes and Development* 13: 1329–1341.

Hayden MS and Ghosh S (2012) NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26(3): 203–34.

He G and Karin M (2011) NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research* 21(1): 159–168.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F and Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway 1. *Biochemical Journal* 334: 297–314.

- Heinrich PC, Castell J V and Andus T (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal* 265(3): 621–636.
- Heldin CH and Moustakas A (2012) Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell and Tissue Research* 347(1): 21–36.
- Hernandez-Gea V and Friedman SL (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* 6: 425–56.
- Heymann F and Tacke F (2016) Immunology in the liver - from homeostasis to disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 13(2): 88–110.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD and Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244(4900): 76–9.
- Hoffmann A and Baltimore D (2006) Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological reviews* 210: 171–86.
- Inagaki Y and Okazaki I (2007) Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56(2): 284–292.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Groote J De, Desmet V, Gedigk P, Korb G, Popper H, Poulsen H, Schmid M, Uehlinger E, Wepler W, Ludwig J, Desmet V, Gerber M, Hoofnagle J, Manns M, Scheuer P, Ishak K, Powell L, Bianchi L, Gudat F, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Callard P, Chevallier M, Degott C, Deugnier Y, Fabre M, Reynés M, Voigt J, Zafrani E, Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, Wollman J, Lok A, Lindsey I, Scheuer P, Thomas H and Scheuer P (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 22(6): 696–699.
- Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, Nakajima Y, Ohkido I, Yokoyama K, Miyachi H, Shimizu T, Murayama A, Kishimoto H, Nagasawa K and Yanagisawa J (2013) A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 123(11): 4579–94.
- Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin C-H, Heldin N-E and ten Dijke P (1998) Transforming Growth Factor  $\beta$  1 Induces Nuclear Export of Inhibitory Smad7. *Journal of Biological Chemistry* 273(44): 29195–29201.
- Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott BT, Klos M, Casteel DE, Frangos JA, Dillmann W, Boss GR and Pilz RB (2014) Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Science signaling* 7(326): ra48.
- Kanzaki T et al (1990) TGF- $\beta$ 1 binding protein: A component of the large latent complex of TGF- $\beta$ 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61(6): 1051–1061.
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH and Blessing M (1999) TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse

## BIBLIOGRAFÍA

model to study liver fibrogenesis. *American Journal of Physiology* 276(4): G1059–G1068.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH and Wrana JL (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF $\beta$  receptor for degradation. *Molecular Cell* 6(6): 1365–1375.

Kiernan R, Brès V, Ng RWM, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S and Benkirane M (2003) Post-activation turn-off of NF- $\kappa$ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *Journal of Biological Chemistry* 278(4): 2758–2766.

Kinnman N and Housset C (2002) Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Frontiers in bioscience* 7: d496-503.

Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH and Mayes MD (1995) Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *The Journal of biological chemistry* 270(7): 3423–8.

Kissin EY and Korn JH (2003) Fibrosis in scleroderma. *Rheumatic diseases clinics of North America* 29(2): 351–69.

Lakos G, Takagawa S, Chen S-J, Ferreira AM, Han G, Masuda K, Wang X-J, DiPietro L a and Varga J (2004) Targeted disruption of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. *The American journal of pathology* 165(1): 203–217.

Lasa M, Gil-Araujo B, Palafox M and Aranda A (2010) Thyroid hormone antagonizes tumor necrosis factor-alpha signaling in pituitary cells through the induction of dual specificity phosphatase 1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 24(2): 412–422.

Lazar MA (1993) Thyroid hormone receptors: Multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews* 14(2): 184–193.

Leask A and ADJ (2004) TGF- signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 18(7): 816–827.

Liang Y-Y, Brunicardi FC and Lin X (2009) Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell research* 19(1): 140–8.

Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunicardi FC, Shi Y, Chen YG, Meng A and Feng XH (2006) PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF $\beta$  Signaling. *Cell* 125(5): 915–928.

Lin Y and Sun Z (2011) Thyroid hormone ameliorates diabetic nephropathy in a mouse model of type II diabetes. *Journal of Endocrinology* 209(2): 185–191.

Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM and Massagué J (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381(6583): 620–3.

Liu F, Pouppnot C and Massagué J (1997) Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes & development* 11(23): 3157–67.

- Liu T and Feng X-H (2010) Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. *The Biochemical journal* 430(2): 191–8.
- Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, MacKenzie KI, Mansfield TA, Klier SA, Goodwin B and Jones SA (2003) Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *Journal of Clinical Investigation* 112(11): 1678–1687.
- López-Fontal R, Zeini M, Través PG, Gómez-Ferrería M, Aranda A, Sáez GT, Cerdá C, Martín-Sanz P, Hortelano S and Boscá L (2010) Mice lacking thyroid hormone receptor  $\beta$  show enhanced apoptosis and delayed liver commitment for proliferation after partial hepatectomy. *PLoS ONE* 5(1): e8710.
- Magness ST, Bataller R, Yang L and Brenner DA (2004) A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology*. 40(5): 1151–1159.
- Massagué J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67: 753–91.
- Massagué J (2012) TGF $\beta$  signalling in context. *Nature reviews* 13(10): 616–30.
- Massagué J, Seoane J and Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes and Development* 19(23): 2783–2810.
- Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819–26.
- Méndez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A and Aranda A (2003) The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO Journal* 22(12): 3102–3112.
- Meng X, Nikolic-Paterson DJ and Lan HY (2016) TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* 12(6):325-38.
- Mitsuhashi T and Nikodem VM (1989) Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat alpha-thyroid hormone receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 264(15): 8900–4.
- Mitsuhashi T, Tennyson GE and Nikodem VM (1988) Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(16): 5804–5808.
- Moras D and Gronemeyer H (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology* 10(3): 384–391.
- Morikawa M, Derynck R and Miyazono K (2016) TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8(5).
- Mountz JD, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F and Pisko E (1983) Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *The British journal of dermatology* 108(6): 679–86.
- Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Roshan M, Bilodeau S, Reddy J, Guenther MG,

## BIBLIOGRAFÍA

Dekoter R and Young RA (2011) Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- $\beta$  Signaling. *Cell* 147(3): 565–576.

Mullur R, Liu YY and Brent GA (2014) Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews* 94(2): 355–82.

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin N-E, Heldin C-H and ten Dijke P (1997a) Identification of Smad7, a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 389: 631–635.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai JI, Heldin CH, Miyazono K and Ten Dijke P (1997b) TGF- $\beta$  receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO Journal* 16(17): 5353–5362.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM and Karin M (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317(5834): 121–4.

Nicolás FJ, De Bosscher K, Schmierer B and Hill CS (2004) Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *Journal of cell science* 117: 4113–4125.

Nishikawa T, Hagihara K, Serada S, Isobe T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, Kawase I, Naka T and Yoshizaki K (2008) Transcriptional Complex Formation of c-Fos, STAT3, and Hepatocyte NF-1 Is Essential for Cytokine-Driven C-Reactive Protein Gene Expression. *The Journal of Immunology* 180(5): 3492–3501.

Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB and Mars WM (2014) Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS ONE* 9(4): 1–14.

Obregon MJ, Pascual A, de Escobar GM and Escobar del Rey F (1979) Pituitary and plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine after hyperthyroidism. *Endocrinology* 104(5): 1467–73.

Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG and Glass CK (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122(5): 707–21.

Palmero I and Serrano M (2001) *Induction of senescence by oncogenic ras. Methods in Enzymology* 333:247-56.

Palomino T, Baretino D and Aranda A (1998) Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *The Journal of biological chemistry* 273(42): 27541–7.

Pålsson-McDermott EM and O'Neill LAJ (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113(2): 153–162.

Pascual A and Aranda A (2013) Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(7): 3908–3916.



- Pascual G et al (2006) Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in endocrinology and metabolism* 17(8): 321–7.
- Paulson M, Pisharody S, Pan L, Guadagno S, Mui AL, David E and Levy DE (1999) Stat Protein Transactivation Domains Recruit p300 / CBP through Widely Divergent Sequences. *Journal of Biological Chemistry* 274(36): 25343–9.
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP and Fallowfield JA (2014) Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews. Immunology* 14(3): 181–94.
- Pendaries V, Verrecchia F, Michel S and Mauviel A (2003) Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* 22(50): 8212–20.
- Pérez-Juste G, García-Silva S and Aranda A (2000) An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 275(2): 1307–1314.
- Perez P, Palomino T, Schonthal A and Aranda A (1994) Determination of the Promoter Elements That Mediate Repression of c-fos Gene Transcription by Thyroid Hormone and Retinoic Acid Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205(1): 135–140.
- Perez P, Schonthal A and Aranda A (1993) Repression of c-fos Gene Expression by Thyroid Hormone and Retinoic Acid Receptors. *The Journal of biological chemistry* 268(31): 23538–23543.
- Pérez Tamayo R (1983) Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3(1): 112–20.
- Perra A, Kowalik MA, Pibiri M, Ledda-Columbano GM and Columbano A (2009) Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype. *Hepatology* 49(4): 1287–1296.
- Perra A, Simbula G, Simbula M, Pibiri M, Kowalik MA, Sulas P, Cocco MT, Ledda-Columbano GM and Columbano A (2008) Thyroid hormone (T<sub>3</sub>) and TR agonist GC-1 inhibit/reverse nonalcoholic fatty liver in rats. *The FASEB Journal* 22(8): 2981–2989.
- Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, Mackenzie JW, Boyd CD and Deak SB (1987) Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *The Journal of biological chemistry* 262(4): 1652–8.
- Pissios P, Tzameli I, Kushner P and Moore DD (2000) Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Molecular cell* 6: 245–253.
- Plateroti M, Kress E and Samarut J (2007) Specific Actions of Thyroid Hormones During Gut Development: Insights from Animal Models. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 20: 119–122.
- Pritchard MT, Cohen JL, Roychowdhury S, Pratt BT and Nagy LE (2010) Early growth response-1 attenuates liver injury and promotes hepatoprotection after carbon tetrachloride exposure in mice. *Journal of Hepatology* 53(4): 655–662.

## BIBLIOGRAFÍA

Qin J, Wu S-P, Creighton CJ, Dai F, Xie X, Cheng C-M, Frolov A, Ayala G, Lin X, Feng X-H, Ittmann MM, Tsai S-J, Tsai M-J and Tsai SY (2013) COUP-TFII inhibits TGF- $\beta$ -induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis. *Nature* 493(7431): 236–40.

Quinton LJ, Jones MR, Robson BE and Mizgerd JP (2009) Mechanisms of the hepatic acute-phase response during bacterial pneumonia. *Infection and Immunity* 77(6): 2417–2426.

Raftery LA, Twombly V, Wharton K and Gelbart WM (1995) Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139(1): 241–254.

Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM and Sigler PB (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375(6528): 203–211.

Refetoff S and Dumitrescu AM (2007) Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 21(2): 277–305.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta L a, Falanga V and Kehrl JH (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(12): 4167–71.

Rosenbloom J, Castro S V and Jimenez SA (2010) Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Annals of internal medicine* 152(3): 159–66.

Rosenfeld MG, Lunyak V V and Glass CK (2006) Sensors and signals : a coactivator / corepressor / epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development* 20(11): 1405–1428.

Saatcioglu F, Deng T and Karin M (1993) A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: Implications for hormonal regulation. *Cell* 75(6): 1095–1105.

Sanchez-Pacheco A, Palomino T and Aranda A (1995) Negative regulation of expression of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 by thyroid hormones through interference with promoter enhancer elements. *Molecular and cellular biology* 15(11): 6322–30.

Sánchez-Pacheco A and Aranda A (2003) Binding of the thyroid hormone receptor to a negative element in the basal growth hormone promoter is associated with histone acetylation. *Journal of Biological Chemistry* 278(41): 39383–39391.

Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Müller M, Blander JM, Tacke F and Trautwein C (2010) Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine* 207(7): 1453–64.

Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB and Thorgeirsson SS (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(7): 2572–6.

- Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P and Longo DL (2005) Phosphorylation of Re1A/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ - independent NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Biological Chemistry* 280(41): 34538–34547.
- Savage C, Das P, Finelli a L, Townsend SR, Sun CY, Baird SE and Padgett RW (1996) Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(2): 790–794.
- Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K and Böttinger EP (2000) Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney international. Supplement* 77: S45-52.
- Schmitz ML, Mattioli I, Buss H and Kracht M (2004) NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5(10): 1348–58.
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA and Brenner DA (2001) The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 34(1): 89–100.
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH and Gelbart WM (1995) Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. *Genetics* 139(3): 1347–1358.
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner D a and Schwabe RF (2007) TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine* 13(11): 1324–1332.
- Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M and Massagué J (2001) TGF $\beta$  influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature cell biology* 3(4): 400–8.
- Shen T, Sun C, Zhang Z, Xu N, Duan X, Feng X-H and Lin X (2014) Specific control of BMP signaling and mesenchymal differentiation by cytoplasmic phosphatase PPM1H. *Cell research. Nature Publishing Group* 24(6): 1–15.
- Shi Y and Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6): 685–700.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J and Pavletich NP (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 94(5): 585–594.
- Shibusawa N, Hashimoto K, Nikrodhanond A a, Liberman MC, Applebury ML, Liao XH, Robbins JT, Refetoff S, Cohen RN and Wondisford FE (2003) Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 112(4): 588–597.
- Shih CH, Chen SL, Yen CC, Huang YAH, Chen CDE, Lee YS and Lin KH (2004) Thyroid hormone receptor-dependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins. *Endocrinology* 145(6): 2804–2814.
- Silveira MG, Mendes FD, Diehl NN, Enders FT and Lindor KD (2009) Thyroid dysfunction in primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver*

## BIBLIOGRAFÍA

*International* 29(7): 1094–1100.

Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, Wilson R, Kommineni C, Rao M and Luster MI (2001) The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicology and applied pharmacology* 177(2): 112–120.

Sinha RA, Singh BK and Yen PM (2014) Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism* 25(10): 1–8.

St Germain DL, Galton VA and Hernandez A (2009) Mini-review: Defining the roles of the Iodothyronine deiodinases: Current concepts and challenges. *Endocrinology* 150(3): 1097–1107.

Stoykov I, Zandieh-Doulabi B, Moorman a FM, Christoffels V, Wiersinga WM and Bakker O (2006) Expression pattern and ontogenesis of thyroid hormone receptor isoforms in the mouse heart. *The Journal of endocrinology* 189(2): 231–45.

Tacke F and Zimmermann HW (2014) Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology* 60(5): 1090–1096.

Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Varga J, Yamamoto T and Nishioka K (2003) Sustained Activation of Fibroblast Transforming Growth Factor- $\beta$ /Smad Signaling in a Murine Model of Scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology* 121(1): 41–50.

Vallabhapurapu S and Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27: 693–733.

Viatour P et al (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in biochemical sciences* 30(1): 43–52.

Visser WE, Friesema ECH and Visser TJ (2011) Mini-review: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Molecular endocrinology* 25(1): 1–14.

Vittoria M, Falzacappa V, Spasic MV, Kessler R, Stolte J, Hentze MW and Muckenthaler MU (2015) STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 109(1): 353–359.

de Vries EM, Fliers E and Boelen A (2015) The molecular basis of the non-thyroidal illness syndrome. *Journal of Endocrinology* 225(3): R67–R81.

Wikström L, Johansson C, Saltó C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thorén P and Vennström B (1998) Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *The EMBO Journal* 17(2): 455–461.

Williams GR (2000) Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology* 20(22): 8329–42.

Wrana JL, Attisano L, Cácamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF and Massagué J (1992) TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71(6): 1003–14.

Wrana JL and Attisano L (2000) The Smad pathway. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11(1–2): 5–

13.

Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X-F and Massagué J (1992) TGF $\beta$  signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71(6): 1003–1014.

Xu L, Kang Y, Çöl S and Massagué J (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF $\beta$  signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular Cell* 10(2): 271–282.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I and Nishioka K (1999) Anti-sclerotic Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$  Antibody in a Mouse Model of Bleomycin-Induced Scleroderma. *Clinical Immunology* 92(1): 6–13.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H and Nishioka K (1999) Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology* 112(4): 456–462.

Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81(3): 1097–1142.

Ying H, Furuya F, Zhao L, Araki O, West BL, Hanover JA, Willingham MC and Cheng SY (2006) Aberrant accumulation of PTTG1 induced by a mutated thyroid hormone  $\beta$  receptor inhibits mitotic progression. *Journal of Clinical Investigation* 116(11): 2972–2984.

Yoshida K and Matsuzaki K (2012) Differential regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. *Frontiers in Physiology* 19(3): 53.

Zambrano A, García-Carpizo V, Gallardo ME, Villamuera R, Gómez-Ferrería MA, Pascual A, Buisine N, Sachs LM, Garesse R and Aranda A (2014) The thyroid hormone receptor  $\beta$  induces DNA damage and premature senescence. *The Journal of cell biology* 204(1): 129–46.

Zavacki AM, Ying H, Christoffolete MA, Aerts G, So E, Harney JW, Cheng SY, Larsen PR and Bianco AC (2005) Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* 146(3): 1568–1575.

Zhang L, Liu C, Meng X, Huang C, Xu F and Li J (2015) Smad2 protects against TGF- $\beta$ 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 400(1–2): 17–28.

Zhang Y, Dedkov EI, Teplitzsky D, Weltman NY, Pol CJ, Rajagopalan V, Lee B and Gerdes AM (2013) Both Hypothyroidism and Hyperthyroidism Increase Atrial Fibrillation Inducibility in Rats. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 6(5): 952–959.

Zhang Y, Feng X, We R and Derynck R (1996) Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383(6596): 168–72.

Zhao J, Shi W, Wang Y-L, Chen H, Bringas P, Datto MB, Frederick JP, Wang X-F and Warburton D (2002) Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of physiology* 282(3): L585–L593.

## BIBLIOGRAFÍA

Zhou Z, Xu M-J and Gao B (2016) Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular and Molecular Immunology* 13(3): 301–15.

Zhu XG, Hanover JA, Hager GL and Cheng SY (1998) Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *Journal of Biological Chemistry* 273(42): 27058–27063.

**ANEXO**

---

## PUBLICACIONES

- Receptors of thyroid hormones, Aranda A, **Alonso-Merino E**, Zambrano A. *Pediatr. Endocrinol Rev.* 2013. 11(1):2-13.
- Autoregulatory loop of nuclear corepressor 1 expression controls invasion, tumor growth, and metastasis. Martínez-Iglesias OA, **Alonso-Merino E**, Gómez-Rey S, Velasco-Martín JP, Martín Orozco R, Luengo E, García Martín R, Ibáñez de Cáceres I, Fernández AF, Fraga MF, González-Peramato P, Varona C, Palacios J, Regadera J, Aranda A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. 113(3):E328-37.
- Tumor suppressive actions of nuclear receptor corepressor 1. Martínez-Iglesias O, **Alonso-Merino E**, Aranda A. *Pharmacol Res.* 2016. 108:75-79.
- Thyroid hormones inhibit TGF- $\beta$  signaling and attenuate fibrotic responses. **Alonso-Merino E**, Martín Orozco R, Ruíz-Llorente L, Martínez-Iglesias OA, Velasco-Martín JP, Montero-Pedrazuela A, Fanjul-Rodríguez L, Contreras-Jurado C, Regadera J, Aranda A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. 113(24):E3451-60.
- The Thyroid Hormone Receptors Inhibit Hepatic Interleukin-6 Signaling During Endotoxemia. Contreras-Jurado C, **Alonso-Merino E**, Saiz-Ladera C, Valiño AJ, Regader J, Alemany S, Aranda A. *Sci Rep.* 2016. 3(6):30990
- The Nuclear Corepressor 1 and the Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Suppress Breast Tumor Lymphangiogenesis. Martínez-Iglesias O, Olmeda D, **Alonso-Merino E**, Gómez-Rey S, González-López AM, Luengo E, Soengas MS, Palacios J, Regadera J and Aranda. *Oncotarget.* Accepted 2016 Oct 22.